



Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunodépression post-infectieuse

David Grimaldi

► To cite this version:

David Grimaldi. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunodépression post-infectieuse. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T049 . tel-00924659

HAL Id: tel-00924659

<https://theses.hal.science/tel-00924659>

Submitted on 7 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS DESCARTES – SITE COCHIN

THÈSE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR
Sciences de la Vie et de la Santé
Ecole Doctorale Gc2iD
Discipline : IMMUNOLOGIE

présentée et soutenue publiquement par

David GRIMALDI

le 25 Novembre 2013

Mécanismes cellulaires et moléculaires de
l'immunodépression post-infectieuse

Jury :

Pr. Luc MOUTHON

Président

Pr. Jean-Daniel CHICHE

Directeur de thèse

Dr. Frédéric PENE

Directeur de thèse

Pr. Fabienne VENET

Rapporteur

Pr. Karim ASEHNOUNE

Rapporteur

Dr. Hafid AIT OUFELLA

Examineur

A Julie, pour son soutien et sa patience lors des moments difficiles

A Liba et Alice,

En mémoire de Chaya

REMERCIEMENTS

Ce travail de doctorat n'aurait pas pu être possible sans le soutien des collègues du laboratoire, toujours disponibles pour discuter des résultats positifs ou négatifs et pour maintenir la motivation. Merci à Anne-Lise qui partageait les affres du doctorat en même temps que moi, à Carole et Michel que j'ai encadré pour leur M1 et M2. Leur bonne humeur et leur gentillesse ont fait de ces années un moment agréable. Merci à Christophe et Nadia, les piliers du laboratoire, dont l'aide et les précieux conseils furent plus d'une fois déterminants dans le succès des manip.

Le médecin que je suis a dû solliciter de nombreuses reprises des membres de l'Institut Cochin : merci à tous pour leur aide. Véronique de la plateforme de microchirurgie, Murielle et Carine de la plateforme de cytométrie, Franck et Sébastien de la plateforme de génomique et naturellement Agnès manitou de l'animalerie. Merci également aux voisins du couloir dont les conseils se sont avérés précieux de nombreuses reprises : Anne-Sophie, Samuel et Claire, Bruno Martin... Merci à Maryline pour son aide indispensable et sa bonne humeur communicatrice.

Bien sûr je n'aurais pas pu faire cette thèse sans la confiance des Pr Mira et Chiche qui m'ont accueilli dans leur laboratoire après un clinat dans le service de réanimation, je remercie le Pr Chiche d'avoir accepté de diriger ma thèse. Merci aux médecins du service qui m'ont aidé pour les inclusions des patients et que je ne peux pas tous citer ici. Un grand merci au Dr Frédéric Pène qui me consacra le temps qu'il fallait alors que lui-même en manquait et à son aide inestimable pour m'aider dans l'écriture du manuscrit. J'espère que sa carrière future sera à la hauteur de ses mérites. J'ai également une pensée pour le Dr Zuber qui me précéda et mis au point le modèle murin. Enfin, je tiens à remercier le Dr Bedos pour m'avoir recruté dans son équipe sans craindre que ce passage en laboratoire n'ait émoussé mon sens de clinicien.

RESUME

Les infections graves entraînent une dysrégulation de la réaction inflammatoire associée à une immunodépression complexe associée à la survenue d'infections nosocomiales. Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent ces phénomènes demeurent largement incompris. A l'interface entre système immunitaire inné et adaptatif, les cellules dendritiques et les lymphocytes innés pourraient être impliqués dans l'immunodépression post-infectieuse. Par ailleurs, les récepteurs de type Toll (TLR) déterminent l'amplitude de la réponse inflammatoire initiale, mais leur contribution dans le développement de l'immunodépression post-infectieuse n'a pas été établie.

Les objectifs de ce projet de recherche étaient d'investiguer le rôle des cellules dendritiques, des lymphocytes de type innés et des voies de signalisation dépendantes des TLRs dans l'immunodépression induite par le sepsis. Nous avons mené ce programme de recherche en combinant une double approche translationnelle et expérimentale. Nous avons étudié la cinétique des cellules dendritiques circulantes chez le patient septique et montré que leur déplétion était associée à la survenue d'infections nosocomiales. L'analyse des trois sous-populations de lymphocytes T innés (lymphocytes $\gamma\delta$, NKT et MAIT) chez le patient septique a montré que seuls les lymphocytes MAIT présentaient une déplétion associée au sepsis sévère, dont la persistance était également corrélée à la survenue d'infections nosocomiales. Enfin, à l'aide de souris knockout nous avons étudié le rôle de TLR2, TLR4 et TLR5 sur la réponse anti-bactérienne dans un modèle murin de pneumonie secondaire à *P. aeruginosa* à distance d'un sepsis polymicrobien subléthal. Nous avons montré que les souris déficientes pour TLR2 étaient protégées de l'infection secondaire grâce à une meilleure clairance bactérienne. Ce travail introduit des perspectives nouvelles dans la physiopathologie de l'immunodépression post-infectieuse et suggère des applications thérapeutiques potentielles.

Mots-clés: sepsis, cellule dendritique, lymphocytes de type inné, lymphocytes MAIT récepteur de type Toll, pneumonie, souris

Etablissement de préparation:

Institut Cochin 22 rue Méchain 75014 Paris
INSERM U1016, CNRS UMR-8104, Université Paris Descartes
Département de biologie cellulaire
"Immunité innée, récepteurs Toll et variabilité de la réponse inflammatoire"

Cellular and molecular mechanisms of sepsis-induced immunosuppression

SUMMARY

Severe sepsis leads to a dysregulated inflammatory response followed by a complex immunosuppressive state that can favor the emergence of nosocomial infections. The cellular and molecular mechanisms that drive the post-infective immunosuppression remain poorly understood. They may involve immune cells that link innate and adaptive immunity such as dendritic cells or innate-like lymphocytes. Furthermore, Toll-like receptors (TLR) are critical determinants of the inflammatory response but their role to the development of sepsis-induced immune dysfunction are unknown.

The aim of this research project was to investigate the role of dendritic cells, innate-like T cells and TLR-dependent signalling pathways in the sepsis-induced immunosuppression process. For this purpose, we combined a translational and experimental approach. We assessed dendritic cells blood count in septic patients and showed that the depletion of dendritic cells was associated with the advent of nosocomial infections. We studied 3 populations of innate-like T-cells ($\gamma\delta$ -lymphocytes, NKT- and MAIT-cells) in septic patients and demonstrated that only the MAIT-cells presented a significant depletion following severe sepsis, the persistence of which was correlated with the advent of nosocomial infection. Last, using knockout mice, we analyzed the relative contribution of TLR2, TLR4 and TLR5 to the host response in a model of late-onset secondary *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia following a sublethal polymicrobial sepsis. We observed that TLR2 deficient mice were specifically protected against the secondary pneumonia through a better bacterial clearance. Our results provide new insights in the pathophysiology of post-infective immunosuppression and suggest potential therapeutic applications.

Keywords: sepsis, dendritic cell, innate-like lymphocytes, MAIT-cells, Toll-like receptor, pneumonia, mouse

SOMMAIRE

RESUME	4
ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION	10
CHAPITRE 1 : ASPECTS CLINIQUES DU SEPSIS	12
..	
1-1. Définitions, épidémiologie et facteurs de susceptibilité.....	15
1-1-1 Définitions	
1-1-2 Incidence	
1-1-3 Facteurs de susceptibilité acquis et innés	
1-2. La mortalité associée au sepsis sévère.....	17
1-2-1 Données épidémiologiques et évolution	
1-2-2 Les interventions visant à diminuer la mortalité dans le sepsis sévère	
1-2-3 Délai et cause de décès au cours du choc septique	
1-3. infections nosocomiales un enjeu de santé publique.....	22
1-3-1 Epidémiologie et définitions	
1-3-2 Les pneumonies nosocomiales : physiopathologie, morbi-mortalité et prévention	
1-4. Immunodépression du patient en phase post-septique : évidence clinique.....	25
CHAPITRE 2 : LA REPONSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION	28
2-1 La réponse immunitaire innée	29
2-1-1 La reconnaissance du pathogène, les PRRs	
2-1-2 Les récepteurs de type Toll	
2-1-3 Les médiateurs de l'inflammation	
2-1-4 Les effecteurs solubles de l'immunité innée	
2-1-5 Les cellules effectrices de l'immunité innée	
2-2 La réponse immunitaire adaptative.....	47
2-2-1 Principes généraux de l'immunité adaptative : les lymphocytes T et B	
2-2-2 Contribution de l'immunité adaptative à la réponse anti-infectieuse	
2-3 Cellules dendritiques et lymphocytes de « type innés » : à l'interface entre immunité innée et adaptative...60	
2-3-1 Les cellules dendritiques	
2-3-2 Les lymphocytes de type innés et leur rôle anti-infectieux	
CHAPITRE 3 : PHYSIOPATHOLOGIE DU SEPSIS : DU PARADIGME INITIAL DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE EXACERBEE A LA DYSREGULATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	74
3-1 Le paradigme initial : une réponse inflammatoire exacerbée.....	75
3-2 Modulation de la réponse inflammatoire par les agents pathogènes.....	77
3-3 Dysrégulation de la réponse immune	80
CHAPITRE 4 : L'IMMUNODEPRESSION POST-INFECTIONNEUSE : ALTERATIONS DU SYSTEME IMMUNITAIRE ET APPORTS DES MODELES EXPERIMENTAUX.....	83
4-1 Dysfonctions immunitaires induites par le sepsis	84

4-2. Apport des modèles animaux	91
CHAPITRE 5 : OBJECTIFS DU TRAVAIL	95
RESULTATS	100
CHAPITRE 1 :	
LA PERSISTANCE DE LA DEPLETION PROFONDE DES CELLULES DENDRITIQUES CIRCULANTES INDUITES PAR LE SEPSIS EST ASSOCIEE A LA SURVENUE D'INFECTIONS NOSOCOMIALES.....	101
<i>Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock (Intensive Care Medicine 2011)</i>	
CHAPITRE 2 :	
LE SEPSIS SEVERE INDUIT UNE DEPLETION SPECIFIQUE DES CELLULES MAIT PARMI LES LYMPHOCYTES T « DE TYPE INNES ».....	107
<i>Specific MAIT-cells behaviour among innate-like T-lymphocytes in critically ill patients with severe infections (manuscrit accepté à Intensive care medicine)</i>	
CHAPITRE 3 :	
L'ABSENCE DU TOLL-LIKE RECEPTEUR 2 PROTEGE LES SOURIS POST-SEPTIQUES D'UNE PNEUMONIE SECONDAIRE A PSEUDOMONAS AERUGINOSA	112
<i>Toll-like receptor 2 deficiency increases resistance to Pseudomonas aeruginosa pneumonia in the setting of sepsis-induced immune dysfunction (Journal of Infectious Diseases 2012)</i>	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	116
BIBLIOGRAPHIE	128
• ANNEXE	147
<i>L'immunodépression post-infectieuse, réalité clinique et données expérimentales. (Réanimation 2012)</i>	
<i>Quand et comment décèdent les patients admis pour choc septique en réanimation ? (Résumé 41è congrès de la SRLF)</i>	

ABBREVIATIONS

AP-1	Activator protein-1
APACHE II	Acute physiology and chronic health evaluation II
AT III	Antithrombine III
BCR	B-cell receptor
BMDC	Bone marrow-derived dendritic cell
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	Cellule dendritique
CFU	Colony forming unit
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomegalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DAMP	Danger associated molecular pattern
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin
dsRNA	Double-stranded RNA
flt3	Fms-like tyrosine kinase-3
flt3-L	Fms-like tyrosine kinase-3 ligand
GM-CSF	Granulocyte monocyte colony-stimulating factor
HLA	Human leukocyte antigen
HMGB1	high mobility group box 1
HSV	Herpes simplex virus
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukine
IL-1ra	IL-1 receptor antagonist
iNOS	NO-synthase inductible
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRF	Interferon response factor
KC	Keratinocyte chemoattractant (= CXCL1)
LB	Lymphocyte B
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPC	Ligature et ponction caecale
LPS	lipopolysaccharide (endotoxine)
LT	Lymphocyte T
mCD	Cellule dendritique myéloïde
MAL	MyD88 adaptator like
MALT	Mucosal associated lymphoid tissues
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (= CXCL-2)
MFI	Mean fluorescence intensity
MIF	Macrophage inhibitory factor
MyD88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
MyD88s	Myeloid differentiation primary-response protein 88 soluble
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-κB	Nuclear factor κB
NLR	NOD-like receptor

NOD	Nuclear oligomerisation domain
PAF	Platelet activation factor
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAVM	Pneumonie acquise sous ventilation mécanique
pCD	Cellule dendritique plasmacytoïde
PRR	Pathogen recognition receptor
RAG	Re- combination-activating gene
RAGE	Receptor for advanced glycation and products
RANK	Receptor activator of NF-κB
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RIG	Retinoic-acid inducible gene
RLR	RIG-like receptor
SAPS II	Simplified acute physiology score II
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SIGIRR	Single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOCS	Suppressor of cytokine signalling
SOFA	Sepsis-related organ failure assessment
ssRNA	Single-stranded RNA (ARN simple brin)
SSTT	Système de sécrétion de type III
sTNFr	Soluble TNF receptor
TCR	T-cell receptor
TFPI	Tissue factor plasma inhibitor
TGF-β	Tumor growth factor-β
TIR	Toll / IL-1 receptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TOLLIP	Toll-interacting protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Tregs	Lymphocytes T régulateurs
TRIF	Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing IFN-β
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
wt	wild-type

INTRODUCTION

La conception classique de la physiopathologie du sepsis reposait en grande partie sur le postulat selon lequel la réaction inflammatoire déclenchée par le pathogène était la principale responsable des défaillances d'organes et de la mortalité. Les perspectives thérapeutiques de modulation de la réaction inflammatoire, prometteuses chez l'animal, se sont avérées inefficaces en pathologie humaine, soulignant la différence entre modèles animaux et réalité clinique. Actuellement, grâce aux progrès des traitements symptomatiques, la grande majorité des patients septiques actuellement pris en charge en réanimation survivent à l'agression initiale mais décèdent de complications acquises en réanimation au premier rang desquelles les infections nosocomiales.

Des observations cliniques confortées par des travaux expérimentaux ont mis en évidence une susceptibilité particulière des patients après une infection sévère. Diverses anomalies immunitaires induites par le sepsis (production de médiateurs anti-inflammatoires, désactivation des monocytes, apoptose des lymphocytes et des cellules dendritiques) contribuent à cette immunodépression post-infectieuse. Les mécanismes qui contrôlent l'acquisition de ces désordres immunitaires sont mal compris mais pourraient impliquer des cellules à l'interface entre système immunitaire inné et adaptatif comme les cellules dendritiques et les lymphocytes innés. Par ailleurs, les récepteurs de type Toll (TLR) déterminent l'amplitude de la réponse inflammatoire initiale, mais leur contribution dans le développement de l'immunodépression post-infectieuse n'a pas été établie.

Ce travail porte sur la contribution de ces mécanismes cellulaires et moléculaires dans la survenue de l'immunodépression post-infectieuse.

Chapitre 1:

Aspects cliniques du sepsis

Les maladies infectieuses sont à l'origine de millions de décès par an dans le monde et représentent un problème majeur de santé publique. En 2011, selon l'OMS, les infections respiratoires basses, les diarrhées, le SIDA, la tuberculose représentaient encore respectivement les 3^e, 5^e, 6^e et 8^e causes de mortalité dans le monde, en particulier dans les pays les plus pauvres où le paludisme et les infections néo-natales s'ajoutent aux maladies précédentes. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>). Par ailleurs, on considère que des agents infectieux sont impliqués dans la genèse de près 25% des tumeurs malignes (1).

Cependant, le terme général de « maladie infectieuse » et la classification utilisée par l'OMS mélange des pathologies virales, parasitaires, mycobactériennes et bactériennes, aiguës ou sub-aiguës qui n'ont pas de lien physiopathologique entre elles. A contrario, les maladies bactériennes graves devraient être regroupées dans les analyses épidémiologiques car leur physiopathologie est voisine. Elle fait appel à une réponse immune caractéristique, potentiellement délétère, désigné par le terme générique de sepsis.

1-1 Définitions, épidémiologie et facteurs de susceptibilité

1-1-1 Définitions

Le terme sepsis recouvre un spectre relativement large de pathologies infectieuses qui ont en commun d'entraîner une réponse physiologique similaire chez l'hôte infecté. Le sepsis est ainsi défini par l'existence d'un foyer infectieux prouvé ou suspecté associé à un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS), entité clinico-biologique définie par la présence d'une fièvre, d'une tachycardie, d'une tachypnée et d'une hyperleucocytose. Les critères de Bone, établis en 1992 (2) et réactualisés en 2003 (3), ont établi une classification en 3 groupes selon la sévérité de la perturbation physiologique: sepsis, sepsis sévère et choc septique. Par rapport au sepsis, le sepsis sévère s'accompagne de la défaillance d'au moins

une fonction physiologique majeure (respiratoire, cardiovasculaire, rénale, hématologique, hépatique, neurologique...). Le choc septique se définit comme un sepsis sévère associé à une hypotension persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat, et nécessitant l'adjonction de drogues vasopressives. Cette classification simple et opérationnelle permet de classer les patients par gravité croissante et a été largement adoptée dans les études épidémiologiques et interventionnelles. Le risque d'évolution du sepsis vers une forme plus sévère (sepsis sévère ou choc septique) est élevé et souvent imprévisible (4).

1-1-2 Incidence

L'incidence du sepsis augmente dans les pays à haut revenu. Il n'existe pas de données épidémiologiques mondiales sur le sepsis sévère et le choc septique, cette entité clinique n'étant pas individualisée par l'OMS. Cependant, les infections respiratoires basses ou pneumonies qui sont essentiellement des infections bactériennes et qui représentent environ la moitié des cas de sepsis, sont à l'origine de près de 3,5 millions de décès par an dans le monde (6,1% des décès) et représentent ainsi la 3^e cause de mortalité. Même dans les pays développés avec un système de santé performant, les pneumonies représentent encore la 5^e cause de mortalité (3,8% des décès) avec 350 000 décès par an (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>).

Dans les pays industrialisés, de larges études observationnelles permettent d'appréhender l'épidémiologie du sepsis. Une étude nord-américaine portant sur une base de données de 750 millions d'hospitalisations dans 500 hôpitaux sur une période de 22 ans rapporte une augmentation annuelle de 8.7% de l'incidence du sepsis (de 82.7 cas pour 100 000 en 1979 à 240.4 cas pour 100 000 en 2000) (5). Angus et coll. ont recueilli les données des codages de 6,6 millions d'hospitalisations au cours d'une année (1995) de 7 états des USA représentant 25% de la population. La prévalence du sepsis était de 2,26 pour 100 hospitalisations avec une incidence estimée 3 pour 1000 habitants. Au total, le nombre de

sepsis sévère aux USA était estimé à plus de 750 000 par an (6). Parallèlement, la proportion de patient admis pour sepsis sévère ou choc septique est en augmentation dans les services de réanimation et représente entre 10 et 20% des admissions (7-9). Il faut aussi souligner que les infections nosocomiales participent à l'augmentation de l'incidence du sepsis, un quart à un tiers des épisodes de sepsis étant dus à des infections nosocomiales (10, 11). L'augmentation de l'incidence du sepsis est en partie attribuable au vieillissement de la population et à la fréquence croissante des comorbidités augmentant la susceptibilité aux infections (immunodépression, cancer, diabète, pathologies chroniques d'organes) (6, 12, 13). En effet, même si le développement d'une maladie infectieuse sévère est soudaine et imprévisible, il existe clairement des facteurs de susceptibilité qui prédisposent à présenter des formes particulièrement sévères d'infection.

1-1-3 Facteurs de susceptibilité acquis et innés

La susceptibilité d'un hôte à une infection donnée peut être liée à des facteurs anatomiques ou biologiques acquis, mais de nombreuses études ont également démontré le poids des facteurs génétiques dans la réponse anti-infectieuse.

Facteurs liés à l'hôte: âge et comorbidités

Au delà de l'espèce, des facteurs liés à l'hôte déterminent la susceptibilité aux pathogènes. L'âge est certainement le principal facteur de risque du sepsis. Si certaines infections sont plus fréquentes chez le sujet jeune en bonne santé (méningococcémie...) que chez le sujet âgé, l'incidence globale du sepsis sévère suit une distribution en U. Ainsi, le risque de sepsis est particulièrement prononcé aux âges extrêmes de la vie. Dans l'étude d'Angus et coll. (6, 14), l'incidence du sepsis sévère était multipliée par 20 entre 30 et 80 ans. Plusieurs raisons expliquent la susceptibilité particulière du sujet âgé aux infections : fréquence des comorbidités et des dysfonctions chroniques d'organes, moindre réserve

physiologique avec défaillance d'organe plus précoce et sénescence du système immunitaire. Par ailleurs, grâce aux progrès de la médecine, de nombreuses pathologies sont devenues chroniques mais exposent à une augmentation du risque infectieux (diabète, chimiothérapie, immunosuppression, transplantation, infection par le VIH) et jouent un rôle pronostique péjoratif (15, 16).

Facteurs liés à l'hôte: susceptibilité génétique aux infections graves

Les études prospectives portant sur les jumeaux homozygotes ont permis de révéler le poids de la génétique dans la susceptibilité aux infections (14). Ces 15 dernières années, de nombreux variants génétiques susceptibles de modifier la relation hôte-pathogène ont été étudiés (17, 18). Ces variants, appelés polymorphismes lorsqu'ils sont présents chez plus de 1% de la population, correspondent le plus souvent à des mutations ponctuelles de gènes de protéines impliquées dans la reconnaissance de l'agent infectieux, la cascade inflammatoire ou le système de la coagulation (19).

La détection des pathogènes est une étape cruciale de la défense anti-infectieuse, et la plupart des polymorphismes fonctionnels des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes sont associés à une modulation de la sévérité des infections. Des polymorphismes des récepteurs *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* et *TLR5* ont ainsi été associés à une susceptibilité accrue aux infections bactériennes et au sepsis sévère (20, 21). De même, des polymorphismes génétiques influençant la réponse inflammatoire (gènes des cytokines TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-10 ; de la protéine kinase IRAK-1 de la voie NF- κ B) ont été associés à la sévérité du choc septique (22, 23). Certains polymorphismes du système HLA de classe II protègent contre le risque de développer un syndrome de choc toxique au cours d'une infection à *Streptococcus pyogenes* en diminuant l'interaction moléculaire entre le superantigène streptococcique, le récepteur du lymphocyte T (TCR) et la molécule du CMH-II et en contrôlant ainsi la réponse cytokinique (24). Enfin, des polymorphismes génétiques qui favorisent l'hypercoagulabilité

(facteur V Leiden) ou l'inhibition de la fibrinolyse (*PAI-1*) ont également été associés à un mauvais pronostic du sepsis sévère (25).

Type d'immunodépression et risque infectieux spécifique

Si les facteurs de susceptibilité aux infections sont souvent envisagés de façon globale, en fait, la plupart sont spécifiques de certaines catégories de pathogènes. Ceci est lié au fait que les différents pathogènes sont combattus par différentes composantes de l'immunité. Par exemple, le déficit en lymphocytes CD4 expose au risque de pneumocystose pulmonaire ou de réactivation de virus du groupe herpès ce qui n'est pas le cas de la neutropénie. Le déficit en neutrophile expose par contre à un risque majeur d'infection bactérienne et fongique mais pas virale. Le déficit en gamma-globuline et l'asplénie entraînent une susceptibilité exclusive aux germes encapsulés tel le pneumocoque et *Haemophilus influenzae b*. Le déficit isolé en monocytes tel qu'il est observé au cours de la leucémie à tricholeucocytes est un facteur de risque majeur d'acquérir une infection intracellulaire pulmonaire : légionnellose, tuberculose. Les facteurs de susceptibilité génétique portent également le plus souvent une spécificité envers un groupe de pathogène, les polymorphismes de TLR4 confèrent une susceptibilité aux infections sévères à Bacille Gram Négatif (BGN), les polymorphismes de la fraction C5 du complément sont associés aux méningococcémies graves, ceux touchant les gènes de MBL (mannose binding lectine) et du récepteur FcγR-II aux infections invasives à pneumocoque (26) pour ne citer que quelques exemples.

1-2 La mortalité associée au sepsis sévère

1-2-1 Données épidémiologiques et évolution

Les études de la fin du 20^è siècle sur les grandes cohortes de patients atteints de sepsis sévère rapportaient une mortalité comprise entre 29% (6) et 48% (8, 27). La mortalité atteignait même près de 60% en cas de choc septique (16). Les progrès techniques de la prise

en charge en réanimation ont permis d'améliorer la survie des patients atteints de sepsis sévère mais le bénéfice est resté ténu au cours des années 90. Les études longitudinales retrouvent ainsi une amélioration lente de la mortalité du sepsis sévère : de 45% à 37.7% entre 1993 et 2003 aux USA (9), de 48,3% à 44,7% entre 1996 et 2004 au Royaume Uni (8) ce qui est également le cas pour le choc septique : de 63% à 58% entre 1993 et 2001 dans une large étude observationnelle française de plus de 8000 patients (7). Plus récemment en 2005, une étude menée en Espagne par Ferrer et col. a retrouvé une mortalité de 44% des patients hospitalisés en réanimation pour sepsis sévère (28), et les données multicentriques de la SSC montrent une mortalité de 37% en Europe et en Amérique du nord et du sud entre 2004 et 2008 en incluant des patients vus aux urgences et non transférés en réanimation (29). Ainsi, malgré la lente amélioration, le choc septique reste une pathologie sévère à l'origine du décès de plus d'un tiers des patients.

1-2-2 Les interventions visant à diminuer la mortalité dans le sepsis sévère

Le pronostic sombre associé au sepsis sévère a motivé la réalisation de nombreux essais thérapeutiques visant à améliorer la survie. Deux études évaluant des interventions non médicamenteuses semblent avoir contribué à l'amélioration du pronostic du sepsis sévère. Rivers et col. dans une étude interventionnelle ont montré l'impact positif d'une prise en charge hémodynamique précoce et agressive (30), tandis que Kumar et coll. ont observé de façon rétrospective que la mortalité augmentait lorsque l'antibiothérapie était retardée de plus d'une heure (31). D'autres essais, basés sur des raisonnements physiopathologiques, ont testé des molécules cherchant à inhiber la réponse inflammatoire de l'hôte (anti-TNF α (32, 33), cortico-stéroïdes à forte dose (34)), à inhiber les effets biologiques de l'endotoxine par injection d'eritoran (35) ou administration orale de lactoferrine (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01273779>)), à compenser les perturbations endocriniennes (opothérapie substitutive cortisonique (36), insulinothérapie intensive (37,

38), hormone de croissance (39)) ou à inhiber l'activation des voies de la coagulation (administration de protéine C activée (40), d'inhibiteur du facteur tissulaire (41, 42), d'héparine (43), d'antithrombine III (44)). Malheureusement, même si certaines de ces stratégies ont pu donner des résultats prometteurs, aucun des essais positifs du début des années 2000 n'a pu être reproduit ultérieurement et l'ensemble de ces traitements est maintenant abandonné ou clairement remis en cause.

Néanmoins, une partie de ces interventions thérapeutiques ont été incluses dans des recommandations internationales récemment actualisées de prise en charge du sepsis sévère, (45) dont l'application a été associée à une diminution de la mortalité hospitalière dans de larges études avant/après. Ainsi la « Surviving sepsis campaign », incluant plus de 15000 patients, a été associée à une diminution de la mortalité hospitalière de 37 à 30,8% entre 2005 et 2008 (29). De façon intéressante lorsqu'on analyse quelles sont les mesures au sein du « bundle » qui sont associées à la diminution de la mortalité, on retrouve constamment l'administration précoce d'une antibiothérapie efficace les autres mesures n'étant pas toujours associées à une amélioration de la survie (28, 29).

Si la répétition des échecs des essais randomisés dans le sepsis sévère/choc septique pose des questions d'ordre méthodologique, quand à la puissance statistique atteinte, à l'hétérogénéité importante des patients, il faut également envisager que les cibles thérapeutiques étaient erronées. Certains auteurs affirment même que la vision actuelle de la physiopathologie du sepsis est trop schématique et que nos connaissances doivent encore s'améliorer (46, 47). En effet, les grands essais interventionnels mentionnés ci-dessus testaient des interventions précoces dirigées contre la réponse pro-inflammatoire de l'hôte et aucun ne visait à prévenir ou traiter spécifiquement les complications post-septiques pourtant en cause dans une grande part des décès.

1-2-3 Délai et cause de décès au cours du choc septique

De très larges études épidémiologiques, multicentriques, incluant plusieurs milliers de patients, ont analysé la mortalité des patients admis en réanimation pour sepsis sévère ou choc septique. Pourtant, il est frappant de constater la pauvreté des données existantes sur les causes et le délai de mortalité des patients et l'évolution de ces paramètres au cours des deux dernières décennies. Dans une étude sur des patients admis en réanimation pour choc septique publiée en 1995, 27% des patients décédaient dans les 48 heures suivant leur admission en réanimation et 77% décédaient avant le 14^e jour (15). Dans une étude ultérieure menée en 2001 et publiée en 2004, le même groupe observait que 74% des décès survenaient avant le 7^e jour (48). Ces études relativement anciennes mettaient donc en évidence une mortalité précoce pour la majorité des décès. Elles n'analysaient pas les causes de décès ce qui limite la portée de ces données. Afin de mieux préciser le délai et la cause de la mortalité des patients admis pour choc septique en réanimation, nous menons actuellement une étude monocentrique au sein du service de réanimation de l'hôpital Cochin sur un collectif de plus de 550 patients admis pour choc septique entre 2008 et 2012. De manière préliminaire, nous avons analysé le devenir de 150 patients non immuno-déprimés ayant été inclus dans des études d'immuno-monitorage en réanimation. Parmi eux, 46 patients sont décédés pendant le séjour hospitalier, dont 65% au-delà de la première semaine (**figure 1**). L'infection initiale n'était directement impliquée dans le décès que pour 24% des patients (choc septique, lésions tissulaires consécutives au processus infectieux). La plupart des patients décédaient en fait de complications acquises en réanimation dans la phase post-septique aux premiers rangs desquelles on notait les pathologies vasculaires et l'acquisition d'infection nosocomiale (31 et 17 % des patients respectivement).

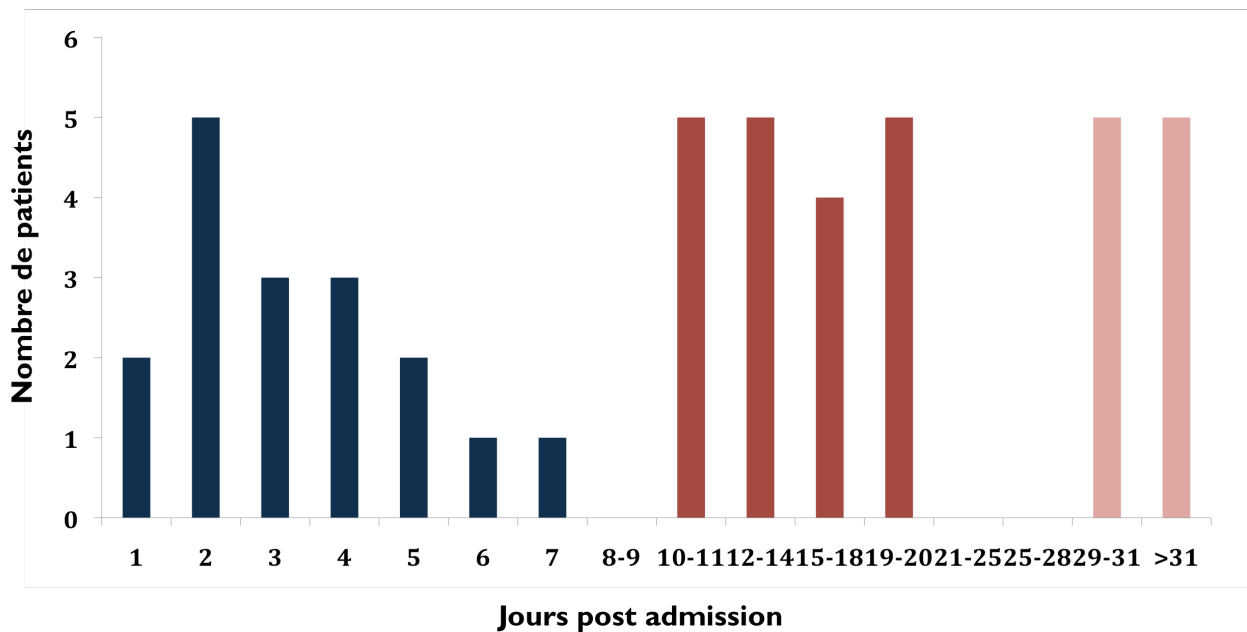


Figure 1 : Représentation du nombre de décès quotidien au cours du temps suivant l'admission en réanimation. On observe trois phases de décès représentés de couleur différentes. Les décès après le 7^e jour représente près de 65% de l'ensemble des décès.

Au delà de leur responsabilité directe dans la survenue du décès, ce qui est toujours difficile à établir, les infections nosocomiales apparaissaient fréquentes puisque 59% des patients décédés après le 7^e jour développaient une infection secondaire acquise en réanimation (Communication orale congrès SRLF 2013, Annexe 2). Ces données observationnelles suggèrent que la survie immédiate des patients admis pour choc septique s'est améliorée mais au prix de défaillances d'organe persistantes et d'un séjour prolongé en réanimation exposant le patient à de nombreuses complications ce qui se traduit par des décès plus tardifs.

Finalement, il faut souligner que l'impact du sepsis sur la survie semble s'étendre bien au delà de la prise en charge hospitalière initiale. Dans la seule étude évaluant la mortalité à très long terme (5 ans) sur un collectif de plus de 1500 patients ayant survécu à un choc septique, les patients septiques présentaient un excès de mortalité tout au long de la période de suivi par rapport à une population contrôle ajustées sur les co-morbidités, suggérant que le sepsis entraîne des conséquences physiopathologiques durables (49).

1-3 Les infections nosocomiales un enjeu de santé publique

Les infections nosocomiales doivent à notre sens faire partie de la réflexion sur le sepsis. En effet, elles représentent d'une part une proportion importante des infections graves devant être hospitalisée en unité de soins intensifs (cf supra) et elles sont d'autre part, une des complications majeures de l'hospitalisation en réanimation pour sepsis sévère.

1-3-1 Epidémiologie et définitions

La fréquence des infections nosocomiales constitue un problème de santé publique : une enquête de prévalence sur un jour donné réalisée en France en 2006 sur 93,6% des lits d'hospitalisation du territoire établissait ainsi que 4,97% des patients hospitalisés présentaient une infection nosocomiale, en diminution modeste (-7,7% en valeur relative) depuis 2001 malgré la mise en place de diverses mesures préventives (<http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Surveillance-en-prevalence>). Comme nous l'avons vu précédemment les études du début des années 2000 montraient que près d'un tiers des épisodes septiques des patients de réanimation étaient causés par des infections nosocomiales (importées ou acquises en réanimation). Cette proportion était certainement sous-estimée car ces études n'incluaient pas les infections liées aux soins ambulatoires (dialyse, hospitalisation de jour etc.). Les conséquences des infections nosocomiales sont importantes : en France, elles sont à l'origine de près de 3500 décès par an (50), et par ailleurs, leur coût, l'image négative des structures de soins et des soignants qu'elles véhiculent sont particulièrement préoccupant. Parmi les infections nosocomiales, les pneumonies représentent la troisième cause d'infections d'origine hospitalière après les infections urinaires et les infections du site opératoire, mais elles sont la première cause d'infection nosocomiale en réanimation (51) et sont les infections les plus graves.

1-3-2 Les pneumonies nosocomiales : physiopathologie, morbi-mortalité et prévention

Les pneumonies nosocomiales en réanimation sont des phénomènes fréquents et le plus souvent sont acquises sous ventilation mécanique (PAVM). Ainsi près de 10% des patients développent une pneumonie nosocomiale au cours de leur séjour en réanimation et l'incidence peut s'élever jusqu'à 28% des patients intubés selon les études (52). La physiopathologie des pneumonies nosocomiales fait intervenir des facteurs tels que l'utilisation de dispositifs biomédicaux invasifs inactivant les mécanismes de défense naturels contre l'infection. Ainsi la durée de ventilation mécanique est un facteur de risque déterminant, l'incidence des PAVM augmentant de 1% par jour de ventilation (53). Chez le patient intubé et ventilé qui nécessite fréquemment une sédation, la présence d'une sonde d'intubation court-circuite les barrières anatomiques des voies aériennes supérieures et altère l'efficacité de la toux. Par ailleurs, l'utilisation fréquente des antibiotiques induit des modifications de la flore et favorise la sélection de bactéries résistantes de manière naturelle ou acquise. Les PAVM imposent un surcoût majeur lié à la prolongation de la durée de ventilation mécanique et d'hospitalisation (54) par contre l'évaluation de leur mortalité attribuable est plus discutée. Si la mortalité brute des patients porteurs de PAVM varie entre 24% et 50% selon les études (52), la mortalité attribuable aux PAVM semble en fait relativement faible dans l'étude la plus aboutie publiée sur ce sujet. En utilisant une approche statistique rigoureuse basée sur une modélisation structurée marginale, Bekaert et coll. ont en effet pu estimer que 4,4% (IC 95% 1,76-7%) des décès intervenus à J30 en réanimation pouvaient être attribués aux PAVM (55). Il faut garder à l'esprit que les cohortes de patients dont sont issues ces données étaient traités par une antibiothérapie efficace ce qui explique probablement la valeur relativement basse de la mortalité attribuable. L'émergence préoccupante de pathogènes multi-résistants aux antibiotiques pourrait bouleverser le pronostic des infections nosocomiales et des PAVM en augmentant la mortalité à un niveau

comparable à celui des infections avant l'ère de l'antibiothérapie. L'amélioration de la prévention de la survenue des PAVM est donc un enjeu majeur des prochaines années. Cette prévention repose sur l'application rigoureuse des mesures d'hygiène et des moyens mécaniques de prévention des PAVM. Cependant l'application de ces mesures semblent avoir ses limites, en effet si les mesures d'hygiène semblent pouvoir permettre de faire disparaître les infections de cathéter centraux avec des densités d'incidence proche de 0/1000 journées-cathéter (56, 57), elles ne semblent pas permettre de faire disparaître les PAVM. Ainsi Bouadma et coll. ont étudié au sein d'une unité de réanimation l'effet de l'implémentation efficace et rigoureuse d'un ensemble de mesures permettant de prévenir la survenue de PAVM. Ils ont observé une diminution significative de l'incidence des PAVM mais qui se stabilisait à une densité d'incidence plancher de l'ordre de 15/1000 patients-jours (**figure 2**) (58). Ainsi, malgré l'application de mesures strictes, il semble qu'il y ait un risque résiduel incompressible de développer une PAVM chez le patient de réanimation ventilé mécaniquement. A l'échelon individuel, la présence des facteurs de risque de PAVM ne permet pas de prédire efficacement sa survenue. En effet, seule une minorité de patients porteurs d'une colonisation trachéale vont effectivement développer une PAVM sans que les facteurs associés à cette dernière étape du développement de la PAVM soit clairement identifiés. Par ailleurs, au delà de la ventilation mécanique et de sa durée, la sévérité de la pathologie sous-jacente et l'intensité des défaillances d'organes sont indépendamment associés au risque de PAVM.

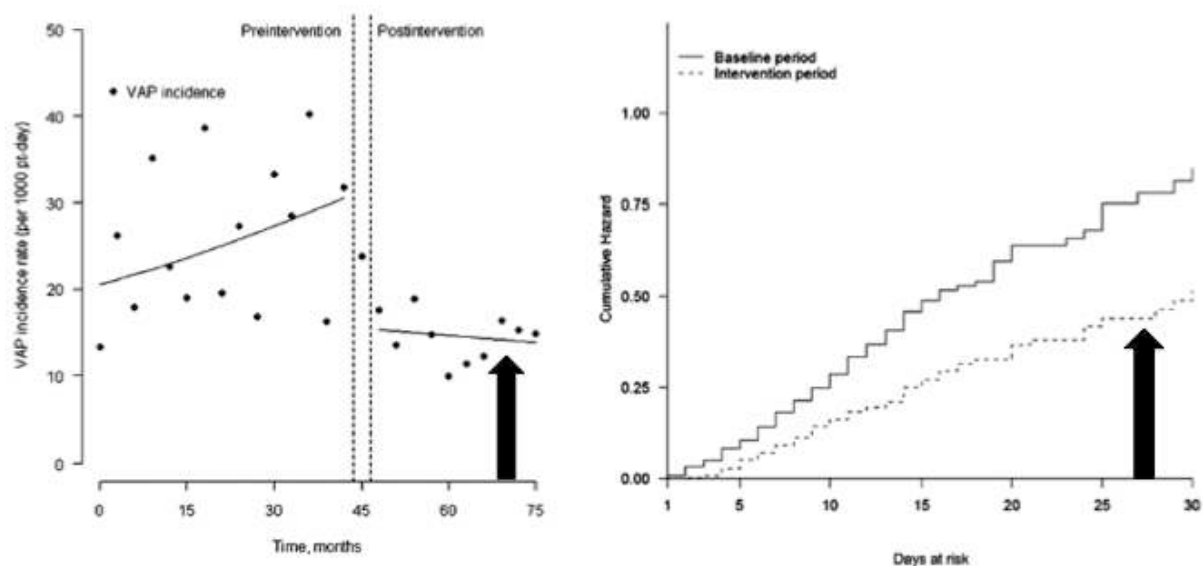


Figure 2 : Analyse de la densité d'incidence (partie gauche) et du risque cumulatif de développement des PAVM (partie droite) avant et après la mise en œuvre rigoureuse des mesures de prévention. On observe que malgré l'efficacité de l'intervention, il persiste un risque résiduel d'acquérir une PAVM de 15 épisodes pour 1000 jours-patients (flèche noire partie gauche) correspondant à un risque cumulé proche de 40% au 30^e jour (flèche noire partie droite) d'après Bouadma et al. (58)

L'ensemble de ces observations suggère qu'il existe une altération des défenses pulmonaires de l'hôte ce qui contribue à la susceptibilité des patients de réanimation aux PAVM. Cette susceptibilité aux infections nosocomiales semble particulièrement marquée chez les patients ayant été admis pour une infection sévère.

1-4 Immunodépression du patient en phase post-septique : évidence clinique

Plusieurs observations suggèrent que certains patients septiques considérés comme préalablement immunocompétents présentent des manifestations cliniques évocatrices d'une immunodépression acquise, telles qu'une anergie cutanée à des antigènes communs témoignant d'un défaut d'hypersensibilité retardée (59) ou la réactivation de virus latents du groupe Herpes (CMV et HSV) (60-62). Dans une étude prospective multicentrique portant sur 120 patients immunocompétents hospitalisés en réanimation, la fréquence cumulée de

réactivation du CMV était de 33% avec un délai médian de 12 jours (extrêmes 3-57 jours). De plus, dans cette étude, la réactivation CMV était un facteur pronostique indépendant associé à la mortalité (63). La réactivation du CMV pourrait ainsi constituer un marqueur robuste d'immunosuppression acquise en réanimation. En outre, ce virus à tropisme leucocytaire est doué de propriétés de subversion de la réponse immunitaire, et pourrait donc jouer un rôle actif dans l'acquisition des dysfonctions immunitaires.

Les principales complications infectieuses observées chez les patients de réanimation et chez les patients septiques en particulier, demeurent les infections bactériennes et en particulier les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) (10). Au delà des facteurs communs à tous les patients ventilés mécaniquement, le risque de PAVM semble particulièrement marqué chez les patients dans les suites d'un choc septique. Dans une étude rétrospective comparant 200 patients admis pour choc septique à plus de 800 patients admis en réanimation pour un autre motif, les patients septiques présentaient spécifiquement un risque accru de survenue d'une PAVM après ajustement sur les variables confondantes (64). Ainsi, des mécanismes physiopathologiques spécifiques à l'état post-septique pourraient altérer les défenses pulmonaires de l'hôte septique et favoriser le développement de PAVM. Par ailleurs, il apparaît maintenant clairement que les patients septiques de réanimation sans immunodépression connue à l'admission ont une susceptibilité accrue aux infections fongiques invasives, dont les candidoses sont de loin les plus fréquentes et associées à un excès de mortalité (65-67). En outre, des cas d'aspergillose pulmonaire invasive, infection opportuniste touchant habituellement des patients sévèrement immunodéprimés, ont été rapportés chez des patients septiques en l'absence de facteurs classiques d'immunodépression, suggérant une altération acquise et profonde des fonctions phagocytaires et lymphocytaires (68, 69).

Le sepsis sévère semble donc entraîner une immunodépression acquise en réanimation. La variété des complications infectieuses observées dans ce contexte suggère un déficit immunitaire complexe, touchant à la fois des mécanismes effecteurs dépendant de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

Chapitre 2:

Réponse immunitaire à l'infection

Lors d'une infection, le système immunitaire permet de contrôler et d'éradiquer le pathogène. Dans ce chapitre nous allons nous attacher à décrire la réponse immunitaire dans son fonctionnement normal en appréhendant successivement ce qui relève de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Nous présenterons dans un prochain chapitre les dysfonctions de cette réponse immune induites lors des infections graves qui font le lit de l'immunodépression post-infectieuse.

1^{ère} partie : la réponse immunitaire innée

Chez les organismes vertébrés, la réponse de l'hôte à une infection fait appel à des mécanismes de défense variés et coordonnés regroupés en 2 grands systèmes biologiques: l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée représente la première ligne de défense contre les infections. Elle est responsable d'une réponse inflammatoire rapide, quasi immédiate, dans le but d'éradiquer le pathogène, d'initier et orienter la réponse immunitaire adaptative en limitant les lésions tissulaires. Ses principaux mécanismes se retrouvent chez l'ensemble des organismes eucaryotes. Les effecteurs de l'immunité innée se décomposent en facteurs humoraux (défensines, collectines, systèmes du complément) qui peuvent se lier aux pathogènes pour les opsoniser ou les détruire et en effecteurs cellulaires (monocytes/macrophages, polynucléaire neutrophiles, cellules NK). L'étape clé de la réponse immunitaire innée est la reconnaissance de déterminants moléculaires très conservés exprimés par les pathogènes (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) par des récepteurs spécifiques (pattern-recognition receptors, PRRs). Les PRRs peuvent être solubles ou cellulaires et dans ce cas soit présent à la surface soit dans les compartiments intracytoplasmiques des cellules de l'immunité innée et de certains épithéliums. Leur

engagement joue un rôle crucial dans l'initiation de la réaction inflammatoire caractéristique de la réponse immunitaire innée.

2-1-1 La reconnaissance du pathogène, les PRRs

La reconnaissance du pathogène est une étape fondamentale dans la réponse anti-infectieuse. Elle est nécessaire pour pouvoir déclencher la réponse inflammatoire qui permet le recrutement des effecteurs de l'immunité au site de l'infection. Elle se fait par l'intermédiaire de récepteurs qui reconnaissent les PAMPs, « motifs » moléculaires présent chez les pathogènes mais absent des cellules eucaryotes. Il existe plusieurs types de PRRs: des récepteurs solubles, des récepteurs cellulaires, cytoplasmiques ou membranaires.

Les récepteurs solubles sont des protéines capables de se fixer aux pathogènes et d'amorcer une cascade d'événement aboutissant à l'activation de la réponse immune. Les principales familles de ce type de PRR sont les collectines (ou lectines de type C) qui sont des protéines reconnaissant les sucres fucose et mannose présents dans la paroi des bactéries et des levures. Ces molécules sont ensuite capables d'activer la voie du complément et/ou de provoquer l'opsonisation du pathogène (reflectine). Les ficolines sont également de la famille des lectines proches structurellement des collectines mais dont les ligands sont les composés N-acétylés comme le N-acétyl-glucosamine composant de la paroi cellulaire bactérienne et fongique. Leur fonction semble très similaire à celles des collectines puisqu'elles permettent l'activation de la voie du complément (70).

Il existe 3 familles de PRRs cellulaires, les NOD (Nucleotide Oligomerization Domain)-like récepteurs ou NLRs, les RIG (Retinoic-acid Inductible Gene)-like récepteurs (RLRs) et les Toll-like récepteurs (TLRs). Les NLRs et les RLRs sont strictement intracytosoliques alors que les TLRs sont des récepteurs membranaires situés soit à la surface de la cellule soit en intra-cellulaire au sein de membranes vacuolaires.

Les NLRs sont présents dans les cellules épithéliales et notamment dans les cellules épithéliales intestinales. Ils reconnaissent des PAMPs, essentiellement des peptides dérivés du peptidoglycane bactérien, grâce à des domaines riches en leucine (LRR) mais aussi des DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) en particulier l'ATP et l'acide urique. La reconnaissance d'un ligand par un NLR entraîne la formation d'un complexe moléculaire appelé inflammasome qui active la caspase-1, protéase qui clive la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 pour permettre la sécrétion sous forme mature des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. Il est maintenant bien établi que certains polymorphismes de NOD-2 sont associés à un risque accru de développer une maladie de Crohn (maladie inflammatoire du tube digestif) suggérant un rôle important pour les NLRs dans l'interaction entre l'épithélium digestif et le microbiote intestinal (71).

Les RLRs sont des hélicases cytosoliques qui reconnaissent l'ARN viral ce qui aboutit à la sécrétion de molécules d'interféron de type I et de cytokines pro-inflammatoires permettant une réponse anti-virale rapide. Il faut noter que les interférons de type I induisent en retour la transcription des RLRs qui ont donc une fonction amplificatrice tant que l'ARN viral est présent (72).

A côté de ces récepteurs cytosoliques assez restreint dans leur capacité de reconnaissance et dans leur expression tissulaire, les TLRs sont une famille de PRRs membranaires, conservés entre les espèces, exprimée par l'ensemble des leucocytes et des cellules épithéliales.

2-1-2 Les récepteurs de type Toll ou TLRs

La découverte en 1996 du rôle des récepteurs Toll dans la défense anti-infectieuse chez la drosophile par l'équipe du Dr Jules Hoffman (73) et l'identification rapide qui s'ensuivit des TLRs chez les mammifères (74, 75) fut un progrès majeur dans la compréhension des mécanismes d'initiation de la réponse inflammatoire et ouvrit de

nombreuses perspectives thérapeutiques pour les maladies infectieuses, inflammatoires et même cancéreuses. Cette découverte fut ainsi récemment récompensée par le Prix Nobel de Médecine en 2011 (76).

Les TLRs sont des récepteurs membranaires capables de reconnaître une grande variété de PAMPs. L'expression des TLRs est quasi-ubiquitaire, ils sont notamment exprimés par les cellules de l'immunité innée, par les lymphocytes, les cellules endothéliales et par les cellules épithéliales naturellement en contact avec le milieu extérieur (épiderme, épithéliums respiratoire et digestif) (77). Les TLRs jouent un rôle majeur dans la précocité du déclenchement de la réponse inflammatoire en réponse à une infection, mais ils contribuent également à l'organisation et à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative en favorisant et en modulant l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T (78, 79). Enfin, des travaux récents impliquent les TLRs dans les processus inflammatoires rencontrés dans des pathologies non microbiennes comme le cancer, l'athérosclérose ou les maladies auto-immunes (80-82).

Structure et ligands des TLRs

Treize récepteurs TLRs ont été identifiés chez les mammifères, dont 10 sont exprimés chez l'Homme. Leur structure est relativement homogène : les TLRs sont des récepteurs trans-membranaires qui appartiennent à la super famille des récepteurs à l'IL-1 ; leur domaine extracellulaire est constitué de motifs répétés riches en leucine (Leucine Rich Repeats) qui sont indispensables pour la reconnaissance du ligand ; leur domaine cytosolique inclut un domaine TIR (pour Toll/Interleukin-1 Receptor) indispensable à la transduction du signal.

Depuis la découverte des TLRs, les ligands des TLR1 à 9 ont été identifiés, alors que les fonctions des TLR10-13 demeurent imparfaitement comprises (83). Les TLRs 1, 2, 4, 5, 6 et 9 sont impliqués dans la reconnaissance de PAMPs bactériens et fongiques alors que les TLRs 3, 7 et 8 sont impliqués dans la reconnaissance de motifs moléculaire viraux (tableau

1). La localisation subcellulaire de ces récepteurs est adaptée à leur spécificité. Les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la surface des cellules et détectent principalement des composants membranaires bactériens. En revanche, les TLRs reconnaissant les acides nucléiques (TLRs 3, 7, 8 et 9) sont localisés dans les compartiments intracellulaires où sont présents les acides nucléiques microbiens après endocytose, mais d'où sont normalement absents les acides nucléiques de l'hôte. La vision initiale d'une spécificité d'un TLR pour un groupe de pathogène (TLR2 pour les Gram positifs, TLR4 pour les BGN) est rapidement apparue inexacte. Une bactérie contient en effet une grande variété de PAMPs et peut donc engager différents TLRs. Par exemple le bacille pyocyanique engage TLR2 par ses lipopeptides membranaires et l'exotoxine ExoS, TLR4 par le LPS et l'alginate de sa capsule, TLR5 par la flagelline et TLR9 par son ADN bactérien (84). Inversement la spécificité de reconnaissance des ligands est accrue par l'existence de complexes de reconnaissance membranaire. En effet, les TLRs peuvent s'associer entre eux ou avec d'autres molécules en fonction des différents ligands ce qui aboutit à augmenter la spécificité de l'interaction (85).

A côté des motifs moléculaires microbiens, les TLRs sont également capables de reconnaître des molécules endogènes, libérées lors de dommages cellulaires et tissulaires. Ces molécules, véritables signaux de danger, ont été appelés DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) ou alarmines. Elles peuvent être des composants de la matrice extracellulaire (acide hyaluronique, fibronectine reconnus respectivement par TLR2 et TLR4) ou des composants intra-cellulaires normalement absents du milieu extracellulaire. Ainsi des protéines nucléaires comme les histones ou HMGB1 (High Mobility Group Box 1) sont reconnues par les récepteurs TLR2 & 4 (86, 87), l'ARN endogène est un ligand de TLR3 (88) enfin l'ADN cellulaire ainsi que les mitochondries sont reconnu par TLR9 (89, 90).

Récepteur	Motif moléculaire	Pathogène
TLR1	Triacyl lipopeptides	Bactéries, Mycobactéries
TLR2	Lipoprotéines	Bactéries
	Acide lipoteichoïque	Bactéries à Gram positif
	Lipoarabinomannane	Mycobactéries
	Glycolipides	Spirochètes
	Zymosan	Levures
	LPS "atypique"	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
TLR3	dsRNA (ARN double-brin)	Virus
TLR4	LPS "classique"	Bactéries à Gram négatif
TLR5	Flagelline	Bactéries flagellées (<i>L. pneumophila</i> , <i>P. aeruginosa</i>)
TLR6	Acide lipoteichoïque	Bactéries à Gram positif
	Diacyl lipopeptides	Mycoplasmes
TLR7	ARN simple-brin	Virus
TLR8	ARN simple-brin	Virus
TLR9	ADN (Riche en CpG non méthylés)	Bactéries, virus, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TLR10	?	?

Tableau 1. Reconnaissance des motifs microbiens par les récepteurs TLRs

L'engagement d'un TLR par un de ces DAMPs initie la même réponse pro-inflammatoire qu'en cas de reconnaissance d'un PAMP. De fait, nombre de ces molécules ont été impliquées dans la gravité des défaillances d'organe secondaire au sepsis. En effet les dommages cellulaires et tissulaires causés par les agents infectieux entraînent une libération des DAMPs qui ont pour effet d'amplifier et de prolonger la réponse inflammatoire en synergie avec les PAMPs (91).

Signalisation intracellulaire des récepteurs Toll

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires de type I qui activent des voies de signalisation aboutissant à l'engagement de plusieurs facteurs de transcription tels NF- κ B (Nuclear Factor κ B), AP-1 (Activator Protein 1) et IRF-3 (Interferon Responding Factor) (92). Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de centaines de gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité. Ils induisent notamment l'expression de molécules impliquées dans le recrutement et l'activation cellulaire au site de l'infection, telles que des cytokines (TNF- α , IFN- γ , IFN- β , IL-1, IL-6, IL-10 et IL-12p70), des chimiokines (KC, MCP-1, CXCL-5...) ou des molécules d'adhésion (VCAM, ICAM, P-selectin). L'expression des molécules du CMH est également sous la dépendance de NF- κ B.

La signalisation intracellulaire dépendant des TLRs est basée sur le recrutement de protéines dites « adaptatrices » sur le domaine TIR intra-cytosolique des TLRs qui ne possède pas d'activité enzymatique propre. Ces adaptateurs permettent le recrutement de protéines kinases, qui vont déclencher une cascade de modification de protéines cytosoliques pour aboutir à la translocation nucléaire des facteurs de transcription. Il existe deux protéines adaptatrices des TLRs _MyD88 et TRIF_ initiant deux voies de signalisation distinctes (**figure 3**). La voie dépendante de MyD88 est commune à tous les TLRs à l'exception de TLR3, et entraîne la translocation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 par l'intermédiaire des kinases IRAK-1 et IRAK-4. L'adaptateur TRIF est retrouvé uniquement dans les voies de signalisation dépendant de TLR3 et TLR4. Son recrutement aboutit à l'activation d'IRF-3 et à une activation retardée et prolongée de NF- κ B. TLR4 est le seul TLR à activer ces 2 voies de signalisation qui, dans ce cadre, contrôlent des fonctions cellulaires différentes : la production des cytokines et chimiokines sont sous la dépendance de la voie MyD88, alors que la maturation et l'activation des cellules dendritiques d'une part et la production d'Interféron de type I d'autre part sont sous la dépendance de TRIF.

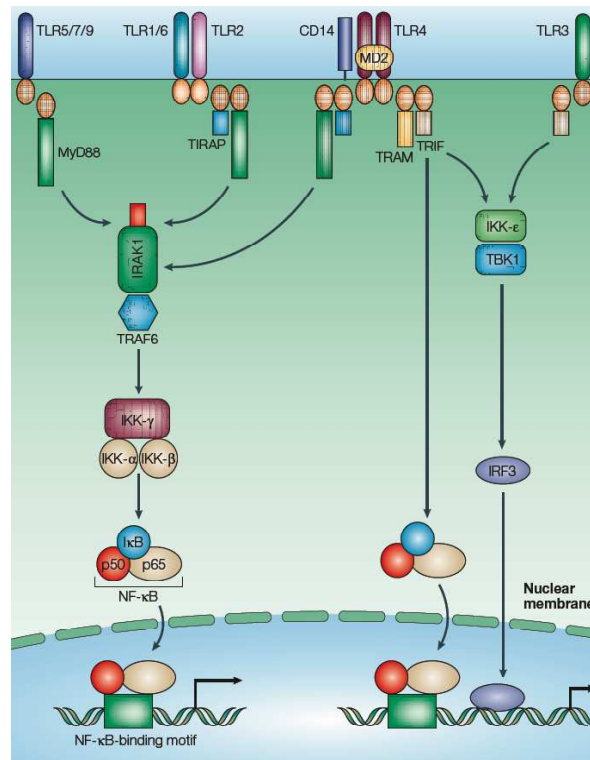


Figure 3. Schéma de la signalisation intracellulaire dépendante des TLRs. L'engagement d'un TLR par son ligand entraîne la dimérisation du récepteur qui induit le recrutement d'adaptateurs qui permettent l'activation de protéines kinases ce qui aboutit à la translocation des facteurs de transcription NF- κ B et IRF-3. D'après Akira et al. (92)

Par ailleurs, certains ligands de TLR4 apparaissent « adaptateur spécifique » en raison des modifications conformationnelles spécifiques qu'ils induisent sur l'homodimère TLR4. Ainsi le nickel n'active que la voie dépendante de MyD88 alors que le lipide A monophosphorylé n'active que la voie dépendante de TRIF (93).

Signalisation inhibitrice des TLRs

L'engagement des TLRs aboutit à une sécrétion rapide et importante de cytokines pro-inflammatoires. Il est donc crucial que les voies de signalisation des TLRs puissent être régulées afin de limiter leur activation non contrôlée et permettre la résolution de la réponse inflammatoire lorsque le pathogène est éradiqué. Les mécanismes de régulation négative sont

multiples et ils interviennent à presque tous les niveaux des voies de signalisation dépendantes des TLRs.

Il existe des molécules solubles, de structure proche des TLRs, qui rentrent en compétition avec les TLRs membranaires, par exemple la forme soluble du TLR4 murin (sTLR4) inhibe la production de TNF- α induite par le LPS (94).

Des protéines membranaires inhibent la signalisation dépendante des TLRs. Le récepteur TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptor), lorsqu'il est engagé par son ligand TRAIL, inhibe la transcription de cytokines pro-inflammatoires dépendante de TLR2. TRAIL étant sécrété en réponse à l'engagement du récepteur TLR2, ce système est un exemple de boucle de rétrocontrôle négatif (95). Le récepteur TIR8/SIGIRR (Single Immunoglobulin IL-1R Related molecule) inhiberait les voies dépendantes de TLR4, 7 et 9 en séquestrant les protéines IRAK et TRAF6 (96) et par un mécanisme proche, la protéine membranaire ST-2 inhiberait les voies de signalisation dépendantes des TLR2 et 4 (97, 98). Après stimulation, les TLRs membranaires sont parfois internalisés ce qui entraîne l'endocytose du ligand, première étape d'une éventuelle présentation par les molécules de CMH, mais ce qui diminue également l'amplitude de la réponse inflammatoire (99). Il existe enfin des molécules cytosoliques qui jouent un rôle dans la régulation négative des voies dépendantes des TLRs (**Figure 4**). Par exemple le variant de l'adaptateur MyD88, appelé MyD88s, se lie au domaine TIR des TLRs et s'hétérodimérise avec une molécule classique de MyD88 ce qui empêche le recrutement des kinases effectrices (100), la kinase IRAK-M inhibe l'action de la kinase IRAK4 ce qui bloque la translocation nucléaire de NF- κ B, la protéine SOCS-1 (Suppressor of cytokines signaling) inhibe la fonction de la kinase IRAK1 (101).

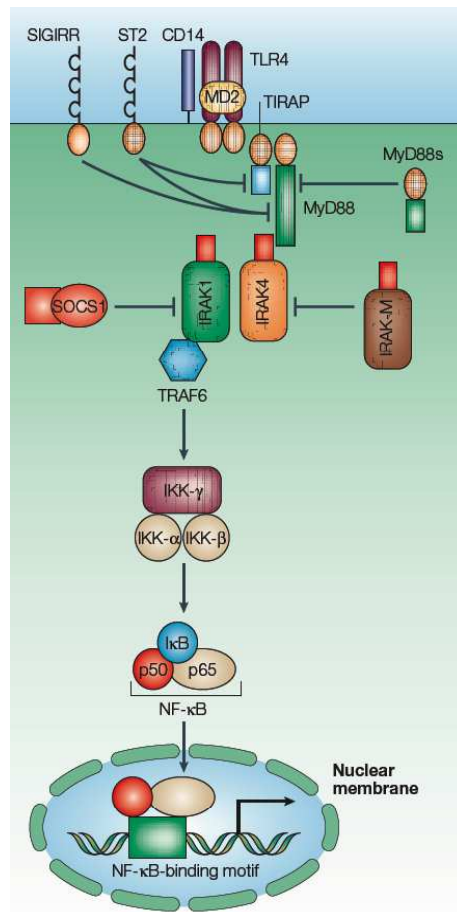


Figure 4. Régulation négative de la signalisation des TLRs. De nombreuses molécules inhibent les voies de signalisation dépendantes des TLRs à différents niveaux: membranaire (SIGIRR, ST2) ou cytosolique (MyD88s, SOCS1, IRAK-M). D'après Akira et al. (92)

La protéine TOLLIP (Toll-interacting Protein) en interagissant avec les domaines TIR des TLR2 et 4 inhibe l'activation des voies dépendantes de MyD88 (102). Récemment notre équipe de recherche a caractérisé le rôle de la molécule IMPDH qui inhibe la transactivation de NF-κB via le recrutement de la phosphatase SHP-1 (103).

Rôle des récepteurs Toll au cours de la réponse anti-infectieuse

Les propriétés de reconnaissance des pathogènes conduisent naturellement les TLRs à jouer un rôle majeur en pathologie infectieuse ce qui a été clairement montré par l'étude de souris déficientes dans l'expression de certains TLRs et par les études génétiques humaines.

Chez la souris C3H, l'engagement de TLR4 par administration de LPS (ou endotoxine), composant de la paroi des bacilles à Gram négatif (BGN), reproduit les symptômes de SIRS (fièvre, frissons, tachycardie, tachypnée), et peut aboutir à une défaillance hémodynamique appelée choc endotoxinique, potentiellement létale, qui mime l'état de choc septique (104). A contrario, l'injection de LPS est sans effet chez des souris de souche C3H/HeJ naturellement dépourvues d'un récepteur TLR4 fonctionnel. Cependant, si les souris C3H/HeJ sont insensibles au LPS, elles sont par contre hypersusceptibles à un inoculum minime d'un BGN comme *Salmonella typhi* (105, 106). De façon analogue, l'invalidation de *Tlr2* prévient l'apparition de défaillance d'organe chez les souris à qui on injecte des PAMPs ligands de TLR2 (lipopeptides bactériens ou zymosan fongique), mais ces animaux sont hypersusceptibles aux infections systémiques à *Staphylococcus aureus* et à *Candida albicans* (107). De nombreux autres modèles murins d'infections monomicrobienne chez des animaux invalidés pour des gènes des voies TLRs ont confirmé le rôle bénéfique de ces voies de signalisation dans la défense anti-bactérienne (108, 109). Ces observations illustrent que le rôle des TLRs dans la physiopathologie du sepsis n'est pas simple à appréhender. Les TLRs sont des « armes à double tranchant » qui entraînent une réponse inflammatoire potentiellement délétère mais nécessaire pour éradiquer les pathogènes. Notons que l'absence de TLR est clairement associée à une surmortalité ce qui montre que le bénéfice supposé à la diminution de la réponse inflammatoire ne compense absolument pas le retard de clairance bactérienne.

Dans certains cas d'infection monomicrobienne, l'absence d'un TLR n'est pas associée à une hypersusceptibilité. En effet, comme nous l'avons vu, certains agents infectieux expriment souvent plusieurs PAMPs spécifiques de plusieurs TLRs ce qui permet une certaine redondance dans la reconnaissance du pathogène. De ce fait, l'invalidation d'un TLR peut avoir des conséquences limitées. Par exemple si TLR2, TLR4 ou TLR5 sont

impliqués dans la reconnaissance de *P. aeruginosa*, l'absence de l'un ou l'autre de ces TLRs, voire de deux à la fois (TLR2 et 4) ne compromet pas les mécanismes de défense spécifique contre les infections pulmonaires causées par ce pathogène (110, 111). Inversement, l'absence de MyD88 qui invalide pratiquement toutes les voies d'activation des TLRs reconnaissant des motifs bactériens est associée à une susceptibilité accrue aux infections à *P. aeruginosa* (112, 113).

Dans les modèles d'infection abdominale polymicrobienne, le rôle des TLRs est moins évident à définir. Ainsi l'invalidation de *Tlr3* améliore la survie des souris (114), de même que celle de *Tlr9* (115), l'inhibition de TLR4 par des antagonistes ou des anticorps spécifiques est également associé à une amélioration de la survie (116, 117) mais de façon un peu discordante les souris TLR4^{-/-} de même que les souris TLR2^{-/-} ont une survie comparable aux souris WT (118, 119). Ainsi le bénéfice de la réponse inflammatoire induite par les TLRs semble moins clair dans les infections polymicrobiennes abdominales que dans les infections mono-microbiennes. Ceci peut être expliqué par le grand nombre de pathogènes différents impliqués dans les péritonites par perforation d'organe creux, le caractère polymicrobien pouvant favoriser la reconnaissance par un PRR autre que le celui invalidé, ou encore par le fait que l'infection intra-abdominale est compartimentalisée dans un organe ne possédant pas de fonction biologique vitale le retard de clairance bactérienne n'étant pas obligatoirement associée à une mortalité supérieure.

Chez l'Homme, des variations génétiques des voies de signalisation dépendantes des TLRs influencent également la réponse cellulaire et la susceptibilité individuelle aux infections graves. Des maladies génétiques orphelines caractérisées par un déficit complet de la kinase IRAK-4 ou de l'adaptateur MyD88 ont été associées à la survenue d'infections récidivantes à germes pyogènes chez l'enfant (120-122). De même, les déficits génétiques de protéines de la voie dépendante de TLR3 (TLR3 lui même, TRIF, TRAF-3 ou UNC-93B)

sont responsables d'une altération de la production d'interférons de type I et ont été impliquées dans une susceptibilité à l'encéphalite herpétique (123). Au-delà de ces maladies monogéniques rarissimes, des polymorphismes de gènes codant pour les protéines des voies dépendantes des TLRs sont également associés à une susceptibilité accrue aux infections et s'intègrent aux facteurs de susceptibilité de l'hôte aux infections graves (cf chapitre 1). Des polymorphismes fonctionnels de TLR2 ou de TLR4, responsables d'une altération de la réponse à leurs agonistes spécifiques, ont été respectivement associés chez l'adulte à des infections sévères par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (124). Un polymorphisme entraînant une perte de fonction de la protéine TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) également appelée MAL (MyD88 adaptor like) adaptateur commun aux voies dépendantes de TLR2 & TLR4 est impliqué dans une susceptibilité accrue aux infections invasives à pneumocoque (125) et plus généralement au sepsis sévère (124). Inversement, des polymorphismes entraînant un gain de fonction comme l'haplotype variant d'IRAK-1 qui induit une hyperactivation de NF- κ B peuvent être aussi associé à une plus grande sévérité des défaillances d'organe (23, 126).

L'ensemble de ces données montrent que les TLRs ont une fonction cruciale dans l'organisation des défenses de l'hôte contre une infection microbienne, au prix du développement d'une réponse inflammatoire potentiellement délétère qui nécessite une étroite régulation.

2-1-3 Les médiateurs de l'inflammation

La reconnaissance du pathogène et l'activation des cellules de l'immunité innée induisent une réaction inflammatoire locale au niveau de l'organe infecté. Cette réponse inflammatoire a pour but d'éradiquer le pathogène et de prévenir la dissémination systémique de l'infection. Elle est normalement régulée par le système immunitaire et le système neuroendocrine (axe hypothalamus-hypophyse-surrénale, systèmes nerveux sympathique et

parasympathique) qui sont capables de contenir le processus inflammatoire local par la production coordonnée de médiateurs anti-inflammatoires. Nous allons décrire dans ce paragraphe le rôle des principaux médiateurs de la réponse inflammatoire.

La reconnaissance d'un pathogène par les PRRs des macrophages et cellules dendritiques tissulaires induit l'activation et la translocation nucléaire de facteurs de transcription dont NF- κ B qui contrôle la transcription de nombreux médiateurs de l'inflammation. Les médiateurs inflammatoires peuvent être séparés en différentes classes selon leurs propriétés biochimiques : les amines vasoactives (histamine, bradykinine, sérotonine), les peptides vasoactifs (substance P, produits de dégradation de la fibrine), les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, INF- γ), les chimiokines (IL-8, MCP-1 CXCL5, ...), les médiateurs lipidiques (PAF, eicosanoids), les anaphylatoxines du complément (C3a et C5a) et la NO-synthase inducible (iNOS) qui augmente la production du NO, molécule qui entraîne une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires et donc une vasodilatation. Ces différents médiateurs contribuent de manière complémentaire à l'initiation et à l'entretien de la réaction inflammatoire locale : augmentation du débit sanguin local, chimiotactisme, adhésion aux cellules endothéliales et diapédèse des polynucléaires neutrophiles, activation de mécanismes microbicides humoraux (anticorps naturels, complément) et cellulaires (phagocytose et bactéricidie).

Les cytokines sont des messagers protéiques intercellulaires impliqués dans des processus biologiques très variés : croissance et différenciation cellulaire, réparation et remodelage tissulaire et régulation de la réponse immunitaire. Au cours d'une infection, les cytokines jouent un rôle crucial dans l'amplification de la réponse immunitaire innée et dans le développement de la réponse immunitaire adaptative. Les cytokines pro-inflammatoires contribuent au déclenchement, à l'entretien et à l'amplification de la réaction inflammatoire du sepsis de part leurs fonctions biologiques pléiotropiques: adhésion et activation des

polynucléaires neutrophiles, perméabilisation sélective de l'endothélium, induction de la production de nouveaux médiateurs inflammatoires...

Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6 et MIF ont été les plus étudiées au cours du sepsis et du choc endotoxinique, mais d'autres cytokines (IFN- γ , IL-12, IL-15, IL-18) sont également impliquées (127-129).

TNF- α , IL-1 β et IL-6 : les cytokines inflammatoires prototypiques

Les cytokines TNF- α et IL-1 β sont des médiateurs primaires de la réaction inflammatoire et de nombreuses études ont mis en évidence leur rôle crucial dans la pathogénèse des défaillances d'organe secondaires à une inflammation systémique. Après injection de LPS, les concentrations plasmatiques de TNF- α et l'IL-1 β augmentent rapidement (30-90 min) mais transitoirement. L'administration de TNF- α ou d'IL-1 β est capable de reproduire les caractéristiques biologiques du challenge endotoxinique. L'IL-6 est également une cytokine précoce de la réponse inflammatoire qui est sécrétée après administration de LPS ou de TNF- α ou d'IL-1 β . Elle est donc un médiateur secondaire et démontre des propriétés à la fois pro- et anti-inflammatoires. D'une part, l'IL-6 augmente l'expression de molécules d'adhésion, le recrutement des leucocytes au site de l'infection et la production de PAF par les macrophages ; d'autre part, elle exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β , et promeut la synthèse de médiateurs anti-inflammatoires comme le TGF- β , les récepteurs solubles du TNF- α (sTNF-R), ou le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1ra).

Dans les modèles animaux de sepsis, les concentrations circulantes ou locales de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-6 ont été corrélées à la sévérité et au pronostic de l'agression (130-133). De plus l'inhibition du TNF- α , et/ou de l'IL-1 par immunothérapie passive a entraîné une amélioration de la survie dans les modèles animaux (134-136). En pathologie humaine, les

taux circulants de cytokines pro-inflammatoires sont relativement peu élevés chez les patients septiques et apparaissent déjà en décroissance au moment de la consultation initiale (137, 138). La persistance de concentrations élevées de TNF- α ou d'IL-6 semble être mieux corrélée au pronostic qu'une seule mesure élevée (139, 140). Cependant, il faut souligner que les stratégies d'inhibition de l'activité du TNF- α par un anticorps monoclonal (32, 33) ou par des récepteurs solubles (sTNF-R) (141, 142), ou de l'activité de l'IL-1 par l'IL-1ra (141, 143) se sont avérées incapables d'améliorer la survie dans les essais cliniques. Ces résultats soulignent les différences entre pathologie humaine et modèles expérimentaux et les limites de ces derniers.

2-1-4 Les effecteurs solubles de l'immunité innée

Après les barrières cutanées et muqueuses, les médiateurs solubles anti-bactériens sont la première ligne de défense contre les infections. Ils agissent immédiatement par interaction moléculaire avec l'agent infectieux et peuvent induire des lésions cellulaires aboutissant à la mort du micro-organisme ou faciliter sa phagocytose (opsonisation) et recruter les cellules de l'immunité innée sur le site de l'infection (effet chémo-attractant).

Le système du complément représente le premier effecteur de l'immunité innée découvert au début du XX^e siècle. Il est constitué par un ensemble de protéines s'activant en cascade par clivage enzymatique. L'initiation de la cascade du complément se fait de 3 façons possibles : fixation de C1 au domaine constant d'immunoglobulines au sein d'un complexe immun circulant (voie classique), activation directe par des motifs moléculaires présent au sein des parois bactériennes (sucres, lipopeptides) dite voie alterne et enfin le clivage des composants C4 et C2 par des protéases associées à des lectines se liant au mannose fongique ou bactérien (Mannose Binding Lectine). Quelque soit la voie utilisée, l'activation du complément aboutit à la formation d'une C3 convertase qui clive le facteur C3 en C3a et C3b. Le facteur C3b permet la formation de la C5 convertase qui clive le facteur C5 en C5a et C5b.

Le facteur C5b se lie à la paroi bactérienne et recrute les facteurs C6-9 pour former le complexe d'attaque membranaire qui crée un pore dans la paroi bactérienne aboutissant à la mort du pathogène par choc osmotique. Par ailleurs, le facteur C3b peut également se fixer sur les parois des bactéries et faciliter alors leur opsonisation par sa fixation avec des récepteurs membranaires au complément situés à la surface des cellules phagocytaires. Enfin, les protéines C3a et C5a appelées anaphylatoxines ont des propriétés chimiotactiques et pro-inflammatoires aboutissant au recrutement de cellules de l'immunité innée au site de l'infection.

D'autres effecteurs solubles sont impliqués dans l'immunité innée ; il s'agit de peptides anti-microbiens qui se fixent sur la membrane des micro-organismes et les détruisent par rupture de la bicouche lipidique. Les β -défensines sont des peptides cationiques et amphipathiques douées d'une activité microbicide très large. Le LL-37 est une cathélicidine contenue dans certains granules intra-cytoplasmiques des PNN et également exprimée par les cellules des épithélia muqueux et cutané.

2-1-5 Les cellules effectrices de l'immunité innée

Les cellules phagocytaires sont les principaux effecteurs cellulaires de l'immunité innée. Les polynucléaires ou granulocytes et les monocytes sont des cellules différenciées à partir de progéniteur médullaire de la lignée myéloïde.

Les granulocytes

Les granulocytes sont caractérisés par leur noyau polylobé et sont séparés en polynucléaires basophiles, éosinophiles et neutrophiles (PNN). Ces cellules sont caractérisées par la présence de granules intracytoplasmique dont le contenu peut-être extériorisé (exocytose). Les PNN représentent la plus grande population des leucocytes circulants et jouent un rôle central dans la défense contre les bactéries comme en témoigne la susceptibilité

particulière des patients neutropéniques aux infections bactériennes sévères. En présence de stimuli inflammatoires locaux, les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion (sélectines et intégrines) qui permettent l'adhérence des PNN puis le franchissement de l'endothélium vasculaire par diapédèse et la migration par chimiotactisme jusqu'au site de l'infection. Ils exercent alors une activité anti-microbienne par de multiples mécanismes : i) phagocytose et destruction des pathogènes après fusion du phagosome avec les lysosomes au contenu acide et contenant des enzymes capables de produire des dérivés radicalaires de l'oxygène; ii) sécrétion de nombreuses molécules cytotoxiques par l'exocytose de leurs granules cytoplasmiques (myéloperoxydase, élastase, défensines, cathélicidines, cathepsine G....) ; iii) extériorisation de l'ADN sous formes de fibres organisée en réseau (144). Ces NETs (Neutrophil extracellular Traps) riches en serine protéases et peptides anti-microbiens forment un réseau dense qui ralentit la dissémination bactérienne (145). Il faut préciser que certaines des substances microbicides excrétées par les PNN sont toxiques pour les tissus ou les cellules de l'hôte (myéloperoxydase, élastase...) et qu'elles contribuent aux dommages tissulaires consécutifs à une infection bactérienne.

Les monocytes/macrophages

Les monocytes sont des cellules mononuclées circulantes dérivées de la lignée myéloïde et sont les précurseurs des macrophages tissulaires. Lors d'un stimulus inflammatoire les monocytes sont de plus capables de se différencier en cellules dendritiques dites inflammatoires (146). Ces cellules expriment de nombreux TLRs et sont capables de sécréter des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Il existe plusieurs sous-populations de monocytes qui se distinguent par l'expression de la molécule CD16 chez l'homme et Ly6C chez la souris et par une sécrétion différentielle de cytokines, les monocytes CD16⁺ ou Ly6C^{hi} sécrétant plutôt des cytokines pro-inflammatoires, les monocytes CD16⁻ ou Ly6C^{low} ayant un profil de sécrétion plutôt anti-inflammatoire. Les monocytes/macrophages ont des capacités de

phagocytose et de présentation de l'antigène aux lymphocytes T par l'intermédiaire de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) qui leur confèrent d'une part un rôle bactéricide et d'autre part un rôle dans l'initiation de l'immunité adaptative.

2è partie : la réponse immunitaire adaptative

L'immunité innée se caractérise par une réponse rapide mais peu spécifique. La multiplicité des PRRs permet certes une certaine discrimination entre les différents pathogènes, mais cette relative spécificité est incomparable avec celle des récepteurs de l'immunité adaptative. En effet, s'il y a quelques dizaines de combinaisons connues de PRRs engagées dans la réponse immunitaire innée, nombre qui peut théoriquement atteindre quelques centaines par analyse combinatoire, l'organisme est théoriquement capable de générer de l'ordre de 10^{18} récepteurs des lymphocytes T (TCR) et $5 \cdot 10^{13}$ récepteurs des lymphocytes B (BCR) ayant tous une spécificité antigénique différente (147). La machinerie génétique qui sous-tend cette propriété est nécessairement complexe et de grande taille ce qui explique que l'immunité adaptative soit spécifique des organismes vertébrés. Elle contribue à la défense anti-infectieuse par des effecteurs propres cellulaires ou humoraux, mais aussi par un rôle d'orchestration et de modulation de la réponse immunitaire tant innée qu'adaptative. En comparaison avec les effecteurs de l'immunité innée, chaque clone d'effecteur de l'immunité adaptative, spécifiques d'un antigène donné, est très peu abondant. Leur implication dans la réponse immune nécessite de ce fait une phase d'expansion clonale préalable ce qui retarde leur action.

2-2-1 Principes généraux de l'immunité adaptative : les lymphocytes T et B

Les lymphocytes T (LT) sont les principaux effecteurs de l'immunité adaptative. Les LT sont générés dans le thymus et expriment un récepteur dimérique à l'antigène appelé TCR

(pour T-cell receptor). Il existe deux grands types de TCR : les TCR composés d'un hétérodimère de chaînes α et β exprimés par les LT $\alpha:\beta$, et ceux composés d'un hétérodimère de chaînes γ et δ (LT $\gamma:\delta$). Au cours de la vie fœtale, le thymus génère majoritairement des LT $\gamma:\delta$, puis, après la naissance, la proportion de LT $\alpha:\beta$ augmente et ces derniers constituent plus de 90% des LT générés. Les LT $\gamma:\delta$ chez l'adulte sont essentiellement adressés vers les épithéliums, et leurs fonctions seront abordées à la fin de ce chapitre. Les LT $\alpha:\beta$ sont distribués en deux populations selon la nature du co-récepteur membranaire du TCR : les LT $CD4^+$ et les LT $CD8^+$.

Reconnaissance de l'antigène

Chaque TCR d'un clone lymphocytaire donné est spécifique d'un peptide antigénique. Le peptide antigénique est issu de la dégradation d'une protéine immunogène appelée antigène. La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte se fait par l'intermédiaire d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) exprimant à sa surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe 2 classes du CMH appelées CMH-I et CMH-II. Le CMH-I est ubiquitaire et toutes les cellules de l'organisme l'expriment constitutivement à leur surface à l'exception des érythrocytes. A l'inverse l'expression du CMH-II est inductible et restreinte d'une part aux CPA « professionnelles » : les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B et d'autre part aux cellules épithéliales thymiques pour permettre la sélection des lymphocytes T au cours de leur différenciation, sujet que nous n'aborderons pas dans ce manuscrit. Le ligand reconnu spécifiquement par un TCR est en fait le complexe formé d'une molécule de CMH et d'un peptide antigénique, à la surface d'une CPA. Les peptides antigéniques présentés par les molécules de CMH-II proviennent de composants protéiques du milieu extracellulaire internalisés dans des vacuoles alors que les peptides présentés par les molécules de CMH-I sont issus de la dégradation des protéines

cytosoliques. Les LT CD8⁺ reconnaissent les molécules du CMH-I alors que les LT CD4⁺ reconnaissent les molécules du CMH-II.

Activation des LT

Les LT matures issus du thymus mais n'ayant pas encore rencontré leur antigène spécifique sont dits naïfs. Ils circulent dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Au sein des organes lymphoïdes, les LT naïfs entrent en contact avec des CPA qui leur présentent les antigènes capturés en périphérie. L'interaction entre le TCR d'un LT naïf et le complexe CMH:peptide dont il est spécifique à la surface d'une CPA induit l'arrêt de la migration du LT. En fonction de l'existence ou non de signaux complémentaires (dit de co-stimulation), les effets de la rencontre entre un LT et une CPA peuvent être éminemment variables. L'interaction stable et prolongée entre les LT et les CPA, nécessaire à l'activation des LT naïfs, est obtenue par la formation d'une « synapse immunologique ». Sous l'effet mobilisateur du cytosquelette, de nombreuses molécules sont recrutées au niveau de la synapse immunologique: le complexe CMH:peptide, les molécules du TCR et du complexe de signalisation associée au TCR et les molécules accessoires de co-stimulation et d'adhésion (**Figure 5**). Les principales molécules de co-stimulation sont les molécules B7.1 et B7.2 (aussi appelées CD80 et CD86), exprimées fortement à la surface des CD matures, et dont le récepteur à la surface des LT est la molécule CD28. D'autres molécules accessoires sont impliquées dans l'interaction entre les LT et les CPA et dans la transduction de signaux activateurs. Par exemple, la liaison de LFA-1 à la surface des LT aux molécules ICAM-1 et -2 à la surface des CPA, joue un rôle dans la stabilisation de l'interaction et pourrait être impliquée dans la transduction de signaux activateurs.

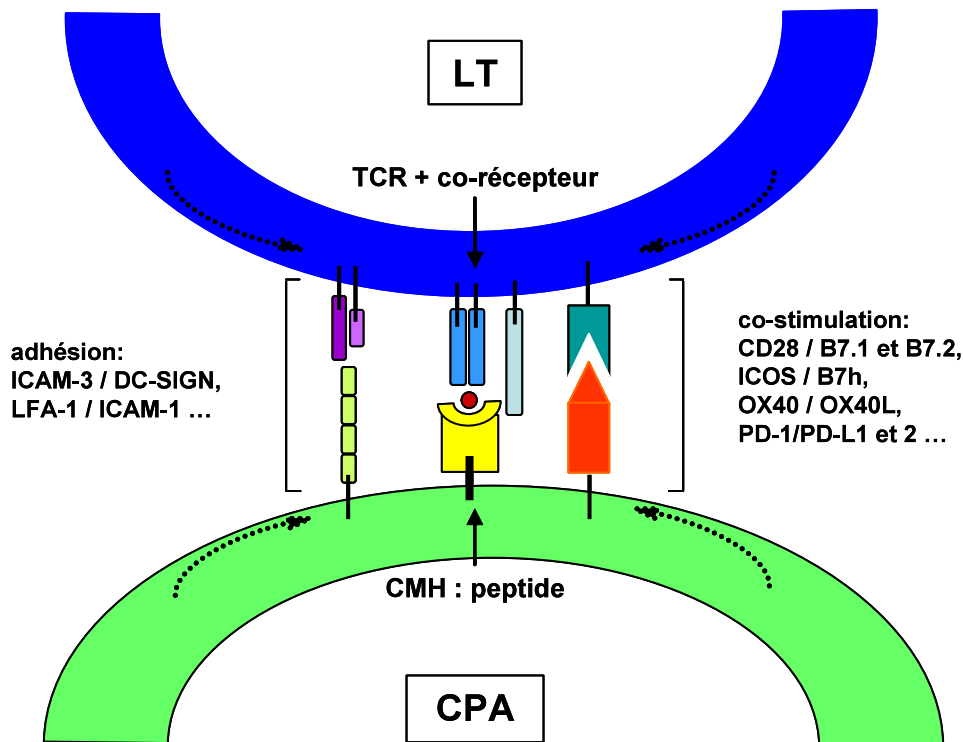


Figure 5. La synapse immunologique. Lorsqu'un LT rencontre une CPA présentant un peptide dont le TCR est spécifique, une plateforme de signalisation membranaire permet le recrutement de nombreuses molécules. Les interactions entre les molécules du LT et de la CPA permettent la reconnaissance du peptide antigénique (premier signal), la délivrance d'un signal de co-stimulation (2^e signal) et la stabilité de l'interaction entre les 2 cellules par des molécules d'adhésion.

L'interaction TCR:CMH associé à la présence d'un signal de co-stimulation provoque l'activation du LT naïf. Le lymphocyte rentre dans un cycle de division cellulaire et sécrète de grande quantité d'IL-2, facteur de prolifération majeur des lymphocytes. Il synthétise et exprime la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) pour former avec les chaînes β et γ , constitutivement présentes à la surface du LT naïf, un récepteur de haute affinité à l'IL-2. La liaison de l'IL-2, par action autocrine et paracrine, à son récepteur de haute affinité, conduit à l'expansion clonale du LT. Après cette phase d'expansion clonale, les LT se différencient en LT effecteurs sous l'effet paracrine d'autres cytokines ce qui a été appelé 3^e signal. Ainsi à partir d'un faible nombre de LT naïfs (inactifs) spécifiques d'un antigène donné, ce processus d'activation aboutit à générer un grand nombre de LT activés, effecteurs et spécifiques de

l'antigène. A l'inverse, en l'absence de 2^e signal, il n'y a pas d'activation du LT et au contraire, développement d'un état anergique induisant une tolérance à l'antigène concerné. Par ailleurs, certaines molécules de co-stimulation sont inhibitrices qu'elles soient à la surface du lymphocyte (molécule CTLA-4 exprimée à la place de CD28, molécule PD-1 pour programmed death-1) ou à la surface des CPA (les molécules PDL-1 et PDL-2 pour PD-1 ligand 1 & 2, par exemple).

Polarisation des LT CD4⁺

Chez les lymphocytes CD4⁺ appelés également T-helper, la phase de différenciation aboutit à une polarisation du clone de LT qui est défini par certaines caractéristiques phénotypiques. Cette polarisation définit différentes sous-populations de lymphocytes aux propriétés biologiques distinctes, essentiellement caractérisées par des profils de sécrétion de cytokines différents, qui orientent la réponse immune vers différents patterns (**Figure 6**). Les lymphocytes T-helper de type 1, ou Th-1, sont à l'origine du phénomène d'hypersensibilité retardée en stimulant l'immunité cellulaire des LT CD8⁺. Les Th-2 sont impliqués dans les phénomènes d'allergie (stimulation des PN Eosinophiles) et d'immunité à médiation humorale (activation des LB) (148). Plus récemment mis en évidence, les Th-17 qui sécrètent les cytokines de la famille de l'IL-17 sont impliqués dans des phénomènes d'auto-immunité non expliqués par le paradigme Th-1/Th-2 (149-151) et dans l'immunité anti-bactérienne. Enfin, les lymphocytes T dits régulateurs qui sont divisibles en de nombreuses sous-populations : les Tregs proprement dit, divisés en Tregs naturels (différenciés dans le thymus) et en Treg inductibles (différenciation tissulaire sous l'action des cytokines IL-10 et TGF- β) ; les Th-3 et les Tr-1. Ces sous-populations régulatrices jouent un rôle suppresseur inverse à celui des Th-1, Th-2 et Th-17 : ils inhibent la prolifération des LT, diminuent l'activation des cellules de l'immunité innée et sont donc essentiels dans le contrôle des réponses immunopathologiques. La polarisation et l'amplification des différentes populations T est

sous le contrôle sélectif de facteurs de transcription spécifiques : T-bet et STAT4 (Th-1), STAT6 et GATA-3 (Th-2), STAT3 et ROR γ t (Th-17) ou Foxp3 (Tregs) et la production autocrine ou paracrine sélective de cytokines IFN- γ et IL-12 (Th-1), IL-4 et IL-5 (Th-2), TGF- β et IL-6 (Th-17), TGF- β (Tregs, Th-3) ou IL-10 (Tr-1) (152-154).

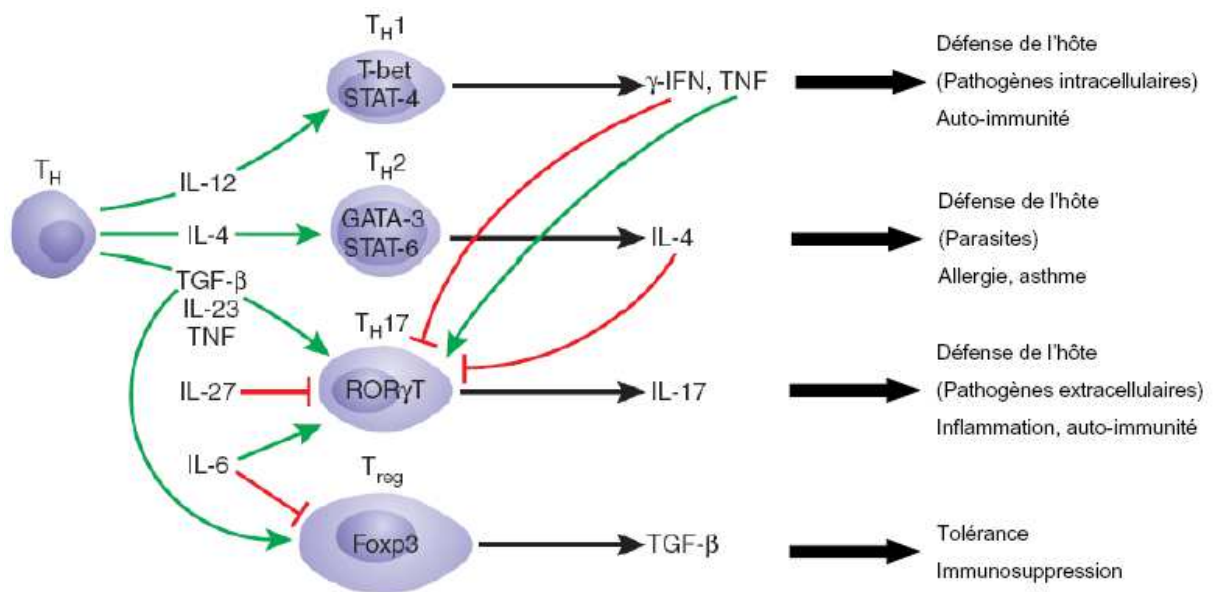


Figure 6. Différenciation et spécialisation fonctionnelle des sous-populations lymphocytaires *T* effectrices (Th-1, Th-2 et Th-17) et régulatrices (Tregs) : rôles sélectifs des cytokines et des facteurs de transcription. D'après Steinman et al. (152)

En résumé, la polarisation des LT dépend de la conjonction des 3 signaux échangés entre CPA et lymphocytes T: l'interaction CMHII-TCR dépendante de l'antigène (signal 1), le signal de co-stimulation délivré par des interactions protéine-protéine (signal 2) et une action paracrine dépendante du type de cytokine produite par les CPA (signal 3). Ainsi, les CPA que rencontrent le LT CD4⁺ jouent un rôle clé dans la différenciation des sous-populations lymphocytaires (155).

Activation et fonction des LT CD8⁺

Comme les lymphocytes T CD4⁺, les LT CD8⁺ naïfs deviennent effecteurs lorsqu'ils rencontrent une CPA et qu'ils reconnaissent son CMH par l'intermédiaire de leur TCR. Les

lymphocytes $CD8^+$ activés sont aussi appelés cytotoxiques. Leur principale propriété, restreinte par le CMH-I, est de pouvoir induire l'apoptose des cellules cibles. Après reconnaissance du complexe CMH-I:peptide, les LT cytotoxiques induisent l'apoptose des cellules cibles en utilisant deux mécanismes distincts :

- la voie perforine–granzymes dans laquelle des granules exocytés vers la cellule cible transfèrent des molécules (perforine, granulysine et granzymes) qui conduisent à l'activation de la voie des caspases et à l'apoptose de la cellule cible (156)
- la voie Fas – ligand de Fas dans laquelle l'engagement de Fas (CD95), récepteur membranaire présent de façon ubiquitaire à la surface des cellules de l'organisme, par son ligand FasL, entraîne une cascade d'évènement intracellulaire aboutissant à l'apoptose de la cellule cible (156).

L'action des LT $CD8^+$ est ainsi doublement favorisée lors d'une sécrétion d'interféron par l'augmentation de l'expression du CMH-I à la surface des cellules cibles et par l'expression de FasL à la surface des LT $CD8^+$.

Fonction des lymphocytes B

Les lymphocytes B reconnaissent l'antigène par le BCR (pour B-cell Receptor) dont le domaine extra-membranaire est analogue à la partie Fab des immunoglobulines, le domaine cytosolique étant capable de transduire le signal de la fixation du ligand. La reconnaissance du ligand provoque l'internalisation du complexe ligand-récepteur qui est dégradé dans les phago-lysosomes. Les peptides provenant de la dégradation du ligand sont alors présentées par une molécule du CMH-II. L'interaction du CMH-II du LB avec le TCR du LThelper entraîne, d'une part l'activation du LT $CD4^+$ (cf supra) _ le LB ayant une fonction de CPA _ et d'autre part induit l'activation du LB qui aboutit à sa prolifération clonale et à la sécrétion d'anticorps (IgM) ayant la même spécificité que le BCR. L'activation du LB déclenche par ailleurs le processus de recombinaison somatique des gènes codant pour les domaines VDJ de

l'immunoglobuline du clone B. Ce phénomène génère d'autres clones de LB avec une spécificité différente. Les clones les plus affins pour le ligand seront préférentiellement activés par les LThelper. La recombinaison somatique se termine par un switch isotypique de la classe d'immunoglobuline et la différenciation du LB en plasmocytes pour aboutir à la présence de plasmocytes sécrétant des IgG ou A hyperspécifiques.

2-2-2 Contribution de l'immunité adaptative à la réponse anti-infectieuse

Si l'immunité innée est seule à être mise en jeu dans les temps les plus précoces d'une infection, l'immunité adaptative contribue secondairement à la défense anti-infectieuse.

Chez l'homme l'analyse du rôle des cellules de l'immunité adaptative dans la réponse antibactérienne est difficile. Les déficits lymphocytaires acquis sont le plus souvent associés à une atteinte de l'immunité innée (corticostéroïdes, infection par le VIH) et touchent le plus souvent plusieurs populations de lymphocytes. Par ailleurs, les déficits lymphocytaires génétiques sont rares et concernent également plusieurs populations de lymphocytes. Ainsi, la plus part des données concernant la fonction des lymphocytes dans l'immunité antibactérienne proviennent des modèles expérimentaux de sepsis mais les résultats de ces études sont souvent délicats à interpréter. Dans le modèle de sepsis polymicrobien induit par une ligature ponction caecale (LPC) les données issues de souris déficientes dans les principales populations de LT (souris KO) sont très souvent contradictoires : dans certaines études les LT $CD4^+$ sont impliqués dans la survie via le contrôle de l'apoptose de l'épithélium intestinal (157) ou via la régulation des fonctions des PNN par l'INF- γ (158), mais d'autres équipes n'ont pas observé de modification de phénotype après déplétion sélective en LT $CD4^+$ (159), la déficience en LT et LB (souris Rag-1^{-/-}) est soit associée à une augmentation de la mortalité après LPC (160) soit ne change pas le phénotype des souris (161), enfin il existe des données montrant que la déplétion en LT conventionnels (TCR- $\alpha\beta$) seraient au contraire bénéfique (162).

Ces contradictions peuvent s'expliquer par les différences de modèle : sévérité variable de la LPC, moyens différents de déplétion des différentes populations lymphocytaires (souris Rag-1^{-/-} ayant bénéficiée d'un transfert adoptif de telle ou telle population, souris CD4 KO, souris déficiente pour la chaîne β du TCR...) et par les limites dans la méthodologie employée. Ainsi, le rôle précis des lymphocytes reste à élucider (163). Une explication possible de cette hétérogénéité pourrait être la non sélectivité des populations cellulaires étudiées. Par exemple, les souris CD4 KO présentes à la fois un déficit en Tregs et en lymphocytes de type Th-1 dont les fonctions biologiques sont presque opposées. Le phénotype peut ainsi être variable en fonction de la sous-population la plus impliquée dans tel ou tel type d'infection au sein de la lignée de souris utilisée. Il nous semble donc plus rigoureux d'étudier le rôle respectif de chacune des sous-populations lymphocytaires.

Implication des différentes sous-populations de LT CD4⁺

Les différentes sous-populations lymphocytaires ont des propriétés différentes ce qui se traduit notamment par des différences dans les profils de sécrétion de cytokine, et des fonctions différentes dans la physiologie de la réponse de l'hôte aux pathogènes.

Les lymphocytes Th-1 sécrètent de l'IFN- γ et expriment la molécule CD40L, ce qui active les macrophages et stimule la bactéricidie intraphagosomiale. Les LTh-1 expriment la molécule FASL qui induit l'apoptose des cellules chroniquement infectés, ils sécrètent de l'IL-2 qui induit la prolifération des LT et des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , Lymphotoxine- α) qui activent les cellules endothéliales pour faciliter la diapédèse des monocytes et PNN (164, 165). Ces différentes propriétés expliquent que les LTh-1 soient impliqués dans la défense contre les pathogènes intracellulaires et dans l'immunité antifongique.

A contrario, les LTh-2 sécrètent les cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 qui sont impliquées dans la génération des différentes classes d'anticorps dont les IgE et dans la

mobilisation et l'activation des polynucléaires éosinophiles. Les LTh-2 sont ainsi impliqués dans la réponse immunitaire humorale et la défense contre certains pathogènes extracellulaires comme les helminthes en stimulant les deux principaux effecteurs de la réponse immune spécifique de ces pathogènes. Par ailleurs, les cytokines de type Th-2 sont capables d'inhiber le développement et la fonction des lymphocytes Th-1 et peuvent donc avoir un effet immunosuppresseur.

Les LTh-17 ont la particularité de sécréter des quantités importantes d'IL-17. L'IL-17 qui est également sécrétée par certaines sous-populations de lymphocytes de type innés (cf infra), favorise le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles au site infecté (action chimiokinique). Elle induit par ailleurs la sécrétion de peptides anti-microbiens (β -défensine, lipocaline, peptides de la famille S100) et l'expression d'autres chimiokines (IL-8, MIP-1 et -2 et MCP-1) (166). Les lymphocytes Th-17 participent ainsi à la clairance bactérienne dans les modèles expérimentaux. Ils semblent jouer un rôle dans le processus d'abcédation (167) ainsi que dans la défense contre les infections cutanées et muqueuses, comme les infections pulmonaires dues à des bactéries pyogènes telles *K. pneumoniae* (168) ou *S. pneumoniae* (169) ou encore les infections fongiques à *Candida sp.* (170).

Les lymphocytes régulateurs ou Tregs jouent un rôle majeur dans la régulation des réponses immunitaires y compris anti-infectieuses. En effet, ils inhibent la prolifération des autres lymphocytes et favorisent l'acquisition d'un phénotype anergique. Ce sont des éléments majeurs de la tolérance immune, ils préviennent les pathologies auto-immunes et limitent les conséquences immunopathologiques induites par l'infection. Leur action peut se faire au détriment de la clairance du pathogène et aboutir à la pérennisation d'une infection. Ils entraînent ainsi une susceptibilité au paludisme et favorise la chronicisation d'infections comme la leishmaniose ou la tuberculose (171). Leur fonction est moins claire dans le sepsis bactérien : si leur proportion augmente dans les suites d'un sepsis sévère (cf infra chapitre 4),

leur absence (que ce soit par déplétion ou en utilisant des souris CD25 KO) ne change pas la survie des souris soumis à une CLP (172, 173) ni celle de souris soumise à une pneumonie à *P. aeruginosa* (174).

Le rôle des lymphocytes CD8⁺ au cours du sepsis a été peu étudié

Les LT CD8⁺ par leur propriété de cytotoxicité, sont surtout impliqués dans l'immunité contre les agents infectieux intracellulaires et donc particulièrement dans l'immunité anti-virale. De façon intéressante, le niveau d'expression des molécules du CMH-I est augmenté par les interférons de type 1 qui sont sécrétés après engagement de TLR3 ou d'autres PRRs intra-cytosoliques. Par ailleurs, l'activation des LT CD8⁺ induit la transcription du gène codant pour FASL dont l'expression membranaire augmente. Ainsi, la réponse immunitaire innée déclenchée par un agent intracellulaire favorise l'efficacité de la réponse cytotoxique.

Il existe par contre peu de données étudiant la fonction des LT CD8⁺ au cours des infections bactériennes sévères. Sherwood et coll. ont observé dans un modèle de LPC létale, que les souris CD8 KO présentaient une amélioration significative mais modeste de leur durée de survie (100% de décès en 72h vs 48h) et la pertinence biologique de cette observation est discutable. En revanche, dans la même étude, la survie était par contre nettement améliorée si l'absence de lymphocytes CD8 était associée à une déplétion en lymphocytes NK (40% de survie prolongée). Cet effet était rapporté à une diminution de la dissémination bactérienne systémique alors que l'inoculum péritonéal était comparable (175). Par ailleurs, le sepsis polymicrobien abdominal semble induire un recrutement des lymphocytes CD8⁺ dans le parenchyme hépatique où ils favorisent l'apoptose des hépatocytes (176). Ces quelques données suggèrent que dans le contexte de sepsis abdominal, les lymphocytes CD8⁺ en association avec les cellules NK, altèrent l'intégrité du parenchyme hépatique et

compromettent ainsi son rôle de filtre préservant la dissémination bactérienne. Cette hypothèse devrait être confirmée par d'autres études.

Les lymphocytes B sont les effecteurs de la réponse humorale

Les lymphocytes B sont les cellules effectrices de la réponse humorale : en réponse à une stimulation de leur BCR par un antigène spécifique et leur rencontre avec un lymphocyte T helper, ils sécrètent des IgM dirigées contre l'antigène de l'agent infectieux (réponse primaire) et prolifèrent avant de se différencier en plasmocytes capables de sécréter d'autres classes d'immunoglobulines plus affines (réponse secondaire). Ce processus qui nécessite une interaction avec un lymphocyte CD4⁺ préalablement activé est relativement long (plusieurs jours) par rapport au déroulement d'une invasion tissulaire bactérienne. En revanche, les réponses humorales antérieures qui se traduisent par la présence d'anticorps spécifiques circulants et de clones de lymphocytes B mémoire, jouent un rôle majeur dans la prévention des infections muqueuses et des infections à germes encapsulés. Il est bien établi qu'un déficit en immunoglobulines (congénital comme le déficit en IgA ou acquis suite à une lymphoprolifération maligne par exemple) expose à la répétition d'infections des voies aériennes et d'autre part à des infections graves à germes encapsulés notamment *Streptococcus pneumoniae*. Dans ce dernier cas, l'IgG spécifique (en particulier celle de sous-classe IgG2) de la capsule de *S. pneumoniae* permet l'opsonisation de la bactérie et sa phagocytose par les PNN.

Ces caractéristiques biologiques classiques des LB ne sont pas *a priori* adaptées à la défense contre une infection bactérienne brutale. Pourtant il semble que les souris invalidées pour la chaîne μ , et donc incapables d'exprimer un BCR fonctionnel et de produire des anticorps, ou déplétées en lymphocytes B grâce à un anticorps monoclonal anti-CD20, avaient une susceptibilité accrue au sepsis polymicrobien péritonéal (177). Les auteurs observaient que la déplétion des lymphocytes B entraînait une diminution de la réponse inflammatoire des

24 premières heures associée à une clairance bactérienne accrue. Ces données suggérant un rôle précoce des LB doivent être interprétées en tenant compte de l'existence de différentes sous-populations de lymphocytes B qui sont toutes invalidées dans ce modèle. En particulier les LB appelés B-1, lymphocytes résidents du péritoine, possèdent des propriétés de type immunité innée et sont capables d'être effecteur très rapidement (cf infra paragraphe 2-3).

L'ensemble des données évoquées dans ce paragraphe montre que l'immunité adaptative contribue à la réponse antibactérienne et à la physiopathologie du sepsis même si le rôle respectif de chacune des cellules effectrices reste incertain. En particulier, il existe des cellules dont les fonctions biologiques sont à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative que nous allons étudier plus en détail dans le paragraphe suivant.

3è partie : Cellules dendritiques et lymphocytes de « type-innés » : à l'interface entre immunité innée et adaptative

Nous avons distingué ces cellules car elles possèdent des propriétés propres à l'immunité innée, comme celle de devenir effectrices rapidement après la reconnaissance d'un pathogène, mais aussi des caractéristiques de l'immunité adaptative comme celle d'agir sous la restriction d'une interaction TCR-CMH. Nous étudierons successivement le rôle des cellules dendritiques et celui des lymphocytes dits « de type innés ». En effet, ces différentes cellules à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative jouent un rôle particulier dans la réponse anti-infectieuse.

2-3-1 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CDs) sont les cellules présentatrices d'antigène les plus caractéristiques. Elles représentent un groupe de cellules d'origine hématopoïétique spécialisées dans la capture et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T. Décrites pour la première fois en 1973 par Steinman (178), découverte récompensée par le Prix Nobel de médecine 2011, les CDs ont été individualisées en plusieurs sous-populations distinctes. Ces cellules sont présentes dans la plupart des tissus du système réticulo-endothélial et sont particulièrement abondantes dans les organes en contact avec l'environnement extérieur (peau et muqueuses). Les CDs expriment de nombreux PRRs ce qui leur permet de détecter l'invasion tissulaire par un pathogène et sont capables d'initier et orienter la réponse adaptative.

Description et classification des cellules dendritiques

L'hématopoïèse des CDs a longtemps été incertaine, car elles semblaient se différencier à partir de précurseurs médullaires myéloïdes ou lymphoïdes. En fait, la présence d'un progéniteur médullaire commun est maintenant établie (179), la capacité de

différenciation en CD étant restreinte aux cellules exprimant le récepteur Flt3. Le facteur de croissance hématopoïétique Flt3-L, ligand du récepteur Flt3, est nécessaire au développement des CD conventionnelles et plasmacytoïdes, comme le montre l'étude des souris déficientes pour Flt3-L qui présentent un déficit quantitatif de CD au sein des organes lymphoïdes (180). *In vitro* la culture de précurseurs médullaires en présence de Flt3-L aboutit à la génération de cellules possédant les caractéristiques des CD conventionnelles et plasmacytoïdes (181, 182). Enfin, alors que les CD ont longtemps été considérées comme des cellules en phase de différenciation terminale dépourvues de capacité de division cellulaire, des études ont montré que l'homéostasie des CD au sein des organes lymphoïdes en conditions basales résultait non seulement du repeuplement constant par des précurseurs sanguins mais également de la réplication cellulaire *in situ*, ces deux mécanismes étant dépendants de Flt3-L (183).

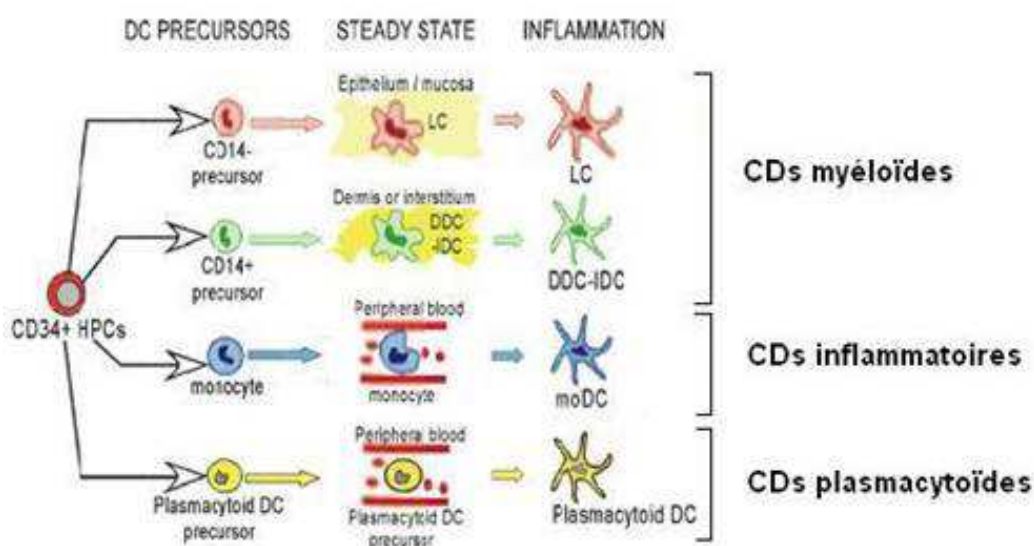


Figure 7 : Classification des cellules dendritiques (CDs) humaines. A partir des cellules souches hématopoïétiques (HPCs), les CDs se différencient en CDs myéloïdes composées de cellules de Langherans (LC), de CDs dermiques ou interstitielles (DDC-IDC), DC dérivée de monocytes (moDC) et en CD plasmacytoïdes. D'après Rossi et al. (184)

L'homéostasie des CD est profondément modifiée en conditions inflammatoires. Les stimuli inflammatoires augmentent le turnover des CD (185) et induisent une différenciation des monocytes en CD (186). En effet, en réponse à un stimulus inflammatoire ou infectieux, les monocytes qui expriment le marqueur de surface Ly6C ont la capacité de capter l'antigène dans les tissus périphériques et de se différencier en CD dites « inflammatoires » qui vont migrer dans les organes lymphoïdes et présenter un phénotype activé (187). Ce phénomène est principalement dépendant de la stimulation des TLRs qui jouent ainsi un rôle crucial dans l'induction de la différenciation des monocytes (146, 188).

Chez l'homme, en raison de la complexité technique de l'étude des CD au sein des tissus, il y a relativement peu de données sur les CD résidentes des organes lymphoïdes. La plupart de nos connaissances proviennent des travaux réalisés à partir des précurseurs circulants des CD, dont on distingue principalement deux grands types : les CD myéloïdes et les CD plasmacytoïdes (**Figure 7**). Les CD myéloïdes sont des cellules présentatrices d'antigène prototypiques, elles expriment l'intégrine de surface CD11c alors que les CD plasmacytoïdes sont caractérisées par leur capacité à produire des interférons de type I (IFN- α , - β et - ω) en réponse à la stimulation de leur récepteur à l'IL-3 (ou CD123) qu'elles expriment spécifiquement par rapport aux mDCs. Elles ont par contre une capacité de présentation d'antigène et d'activation des LT moins importantes que les mDCs (184). Il faut noter que la classification des CD est légèrement différente chez la souris.

Fonctions biologiques des cellules dendritiques

Les CD sont les seules cellules de l'organisme qui expriment constitutivement le CMH-II ce qui les rend capables de stimuler les LT dès la rencontre avec un antigène du non soi. Elles ont donc la capacité d'initier, d'orienter et de réguler la réponse immunitaire adaptative. Cette fonction est principalement déterminée par le niveau de maturation et

d'activation de la cellule dendritique au moment de l'interaction avec le LT helper (**figure 8**) (189).

Induction de la tolérance

Les CD immatures sont stratégiquement présentes dans les tissus fréquemment exposés aux pathogènes (peau, tube digestif, voies aériennes). Elles détectent et phagocytent continuellement les substances endogènes ou exogènes présentes dans le microenvironnement. Les CD immatures présentent des capacités limitées de présentation de l'antigène. Après leur rencontre avec l'antigène, ces CD migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, où elles présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4⁺.

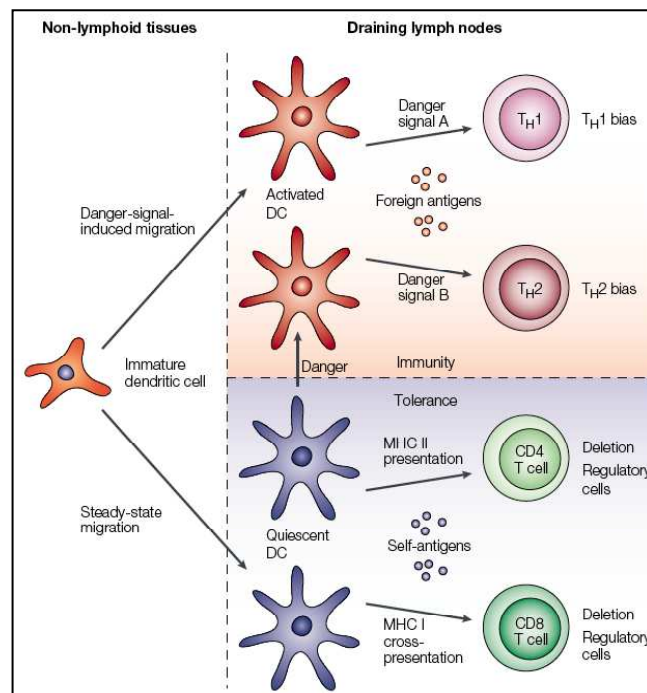


Figure 8. Régulation de la réponse immunitaire par les CD. En l'absence d'infection ou de signal de danger, la migration des CD vers les organes lymphoïdes secondaires est limitée. Les CD quiescentes maintiennent la tolérance périphérique et préviennent l'activation des lymphocytes T. L'infection active les CD et augmente leur capacité de migration vers les organes lymphoïdes où elles activent les lymphocytes T spécifiques de l'antigène pour initier la réponse immunitaire en fonction du type d'agression. D'après Shortman et al. (190)

A l'état immature les CD_s n'expriment pas de molécules de co-stimulation (cf paragraphe 2-2) et l'engagement du TCR en l'absence de 2^e signal induit un phénomène de tolérance par anergie, délétion ou orientation vers une fonction régulatrice des lymphocytes T. Les CD_s immatures jouent donc un rôle majeur pour prévenir l'activation inutile voire délétère des LT envers des auto- ou des allo-antigènes (191). En présence d'un signal de danger (PAMP ou DAMP), la fonction des CD_s s'inverse pour promouvoir la stimulation de la réponse immune et inflammatoire.

Maturation des cellules dendritiques

La présence d'un stimulus inflammatoire ou infectieux entraîne un processus appelé maturation des CD_s. Les CD_s immatures expriment de multiples PRRs capables de reconnaître des PAMPs ou des DAMPs. Les TLRs apparaissent particulièrement importants dans la régulation du processus de maturation des CD_s. La stimulation *ex vivo* des CD_s par du LPS (ligand de TLR4) ou du CpG DNA (ligand de TLR9) induit leur maturation (192, 193) ce qui a été confirmé *in vivo* auprès des CD_s résidentes (194). Par ailleurs, des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 sont également capables d'induire la maturation des CD_s (195, 196).

La maturation des CD_s se caractérise par la perte des capacités d'endocytose et de phagocytose, par l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 impliqué dans la migration vers les organes lymphoïdes, par la production de cytokines immunostimulantes et par l'expression membranaire de molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40. Les caractéristiques de la stimulation des CD_s (type de PRRs engagés, microenvironnement...) déterminent le profil de leur sécrétion cytokinique et de ce fait influencent la réponse immunitaire adaptative (3^e signal).

Orientation de la réponse des lymphocytes T auxiliaires

L'orientation de la réponse immunitaire adaptative constitue une fonction biologique majeure des CD, et permet théoriquement d'induire une réponse lymphocytaire T adaptée à la nature de l'agression. Comme nous l'avons vu, la polarisation des lymphocytes T dépend de l'état de maturation des CD, de la durée de l'interaction entre CD et lymphocytes T et du pattern de cytokines sécrétées par les CD au sein du microenvironnement (**Figure 9**). Schématiquement, les cytokines IL-12p70 et IL-10 sont respectivement impliquées dans l'orientation des réponses Th-1 et Th-2, l'IL-22 et l'IL-23 permettent la différenciation et l'amplification de lymphocytes Th-17, l'IL-10 et le TGF- β entraînent l'amplification des T régulateurs (197).

Le pattern de cytokines sécrétées par les CD est modulé par plusieurs paramètres : le type de CD myéloïdes ou plasmacytoïdes générées *ex vivo* semblent être un facteur important, par exemple, bien que les deux populations cellulaires expriment le récepteur TLR7, la stimulation de TLR7 entraîne une sécrétion d'IL-12 par les CD myéloïdes et d'IFN- α par les CD plasmacytoïdes (198). La nature du stimulus des CD joue également un rôle important dans l'orientation des réponses immunes. Ainsi le LPS purifié à partir d'*E. coli* induit une réponse de type Th-1, alors que le LPS "atypique" de la bactérie *Porphyromonas gingivalis* induit une réponse de type Th-2 (199). La stimulation des CD plasmacytoïdes par un ligand de TLR3 (dsRNA) induit spécifiquement la production d'interferons de type I essentiels dans la réponse antivirale médiée par les LT CD8⁺. Outre les TLRs, d'autres récepteurs de motifs microbiens ont été impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative par les CD. La protéine cytosolique NOD2 qui reconnaît un motif peptidique du peptidoglycane, est impliquée dans la production d'IL-23 par les CD (200), alors que l'engagement de DC-SIGN oriente une réponse de type Th-2 (201).

Ces données issues d'études expérimentales n'intègrent probablement pas la complexité des phénomènes moléculaires lors de l'invasion d'un pathogène. L'expression des PRRs par les cellules dendritiques diffère selon leur localisation tissulaire. Par exemple les CDs de la *lamina propria* de l'intestin expriment TLR5, mais pas TLR4, ce qui restreint l'activation de ces cellules à la présence de bactéries flagellées (pathogènes), les bactéries commensales non flagellées n'exprimant que le LPS, ligand de TLR4, n'étant pas reconnues. Parallèlement, un pathogène donné possède un panel varié de PAMPs qui vont simultanément stimuler plusieurs récepteurs. La coopération et la synergie entre différents PRRs modulent la réponse des CDs. Ainsi l'activation combinée de différents TLRs renforce le phénomène de maturation des CDs et augmente la production des cytokines IL-12p70 ou TNF- α (202). La stimulation combinée de TLR2 et NOD2 dans les CDs semble induire spécifiquement la sécrétion d'IL-23 qui permet la différenciation des LT CD4⁺ en Th-17 (200).

Rôle des cellules dendritiques au cours du sepsis

Peu d'études ont investigué le rôle direct des CDs au cours du sepsis, mais des données suggèrent que le maintien de leur nombre et de leur fonction sont des éléments importants dans la réponse anti-infectieuse.

Les CDs représentent une source majeure d'IL-12 dont le rôle bénéfique au cours du sepsis polymicrobien a été suggéré par l'utilisation d'anticorps neutralisants et de souris déficientes en IL-12 (127, 203). En effet, dans ces études utilisant un modèle de péritonite polymicrobienne (LPC), l'absence d'IL-12 entraîne une altération de la phagocytose avec défaut de clairance du pathogène et une majoration de la réponse inflammatoire systémique se traduisant par une mortalité accrue des animaux. La génération de souris transgéniques (B6.FVB-Tg^{Itgax-DTR/EGFP.57}Lan/J) qui expriment le récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de *cd11c* a permis d'appréhender le rôle propre des CDs au cours de la réponse septique initiale. En effet, l'administration de toxine diphtérique chez ses animaux

entraîne une déplétion des cellules exprimant le CD11c (les CD) qui se traduit par un déficit majeur en CD conventionnelles (>85%), et en CD plasmacytoïdes (75%). La déplétion des CD entraîne une augmentation de la mortalité lors d'une LPC partiellement prévenue par le transfert de CD exogènes. Le mécanisme d'action des CD dans ce modèle ne semble pas être lié à une activité antibactérienne accrue ou à une modulation de la réaction inflammatoire et reste mal compris (204). Le rôle positif des CD a été confirmé dans un modèle murin de bactériémie à *Staphylococcus aureus* utilisant les mêmes souris transgéniques (205). L'effet délétère de la déplétion des CD semblait être principalement lié à une altération de la bactéricidie des PNN sans altération de leur chimiotactisme. Il faut souligner que dans cette étude, les conséquences du déficit en CD pouvaient être prévenues par l'administration exogène d'IL-12 témoignant là encore du rôle crucial de cette cytokine dans la réponse antibactérienne.

Ces données suggèrent que les CD sont importantes dans la réponse anti-infectieuse mais elles proviennent d'un nombre limité d'études et n'ont pas été confirmées chez l'homme. Inversement, les conséquences du sepsis sévère sur l'homéostasie des CD ont été plus largement étudiées comme nous le verrons au chapitre 5. Auparavant, nous allons décrire le rôle des lymphocytes de type innés, autres cellules du système immunitaire adaptatif dont les fonctions permettent de faire le lien entre système immunitaire inné et adaptatif.

2-3-2 Les lymphocytes de type innés et leur rôle anti-infectieux

Généralités, les différentes populations

Comme nous l'avons vu précédemment, la spécificité du récepteur (TCR ou BCR) d'un clone lymphocytaire provient du réarrangement aléatoire de plusieurs gènes des chaînes α et β du TCR ou du domaine variable de la chaîne d'immunoglobuline du BCR. Cette caractéristique spécifique des lymphocytes définit le système immunitaire adaptatif car elle permet l'existence d'une multiplicité considérable de clones lymphocytaires portant une

spécificité propre. Certaines sous-populations lymphocytaires (incluant des clones lymphocytaires différents mais ayant des caractéristiques biologiques communes) font exception car elles regroupent des LT dont le récepteur membranaire est encodé par un nombre restreint de combinaison de gène avec une diversité très limitée des différents clones de LT qui la compose. Au sein de ces sous-populations lymphocytaires particulières, chaque clone est donc bien plus abondant qu'un clone lymphocytaire conventionnel. De ce fait, ces lymphocytes ne nécessitent pas de phase de prolifération pour devenir effecteurs et sont donc mis en jeu bien plus rapidement que les lymphocytes conventionnels. Ces 2 propriétés biologiques : répertoire limité et réponse effectrice rapide sans prolifération, sont des propriétés habituelles des cellules de l'immunité innée. Ces lymphocytes particuliers ont donc été nommés lymphocytes de type inné ou « Innate-like lymphocytes ». Il est cependant clair que ces cellules nécessitent les enzymes recombinases RAG-1 et RAG-2 pour exprimer leur récepteur de surface et sont donc formellement des cellules du système immunitaire adaptatif.

Les lymphocytes de type inné peuvent être de lignées B ou T. Nous présenterons les principales populations de lymphocytes de type innés que sont les lymphocytes B-1, les lymphocytes T $\gamma\delta$ et 2 sous-populations de lymphocytes T $\alpha\beta$, les NKT et les MAIT.

Les lymphocytes B de type innés

Au sein des lymphocytes B, certaines sous-populations présentent une diversité restreinte de leur BCR. Les lymphocytes dits « B-1 » possèdent ainsi des propriétés distinctes du reste des lymphocytes B "conventionnels". Ils se différencient au cours du développement *in utero* et utilisent un ensemble restreint de réarrangement génique pour générer leur BCR. Ils sont capables de se renouveler dans des tissus non lymphoïdes et sont principalement localisés au sein des cavités pleurales et péritonéales où ils constituent la majorité des lymphocytes résidents. Les cellules B-1 semblent diriger leur réponse humorale essentiellement contre les antigènes polysaccharidiques et sont capables de produire des IgM

dans les 48 heures qui suivent l'exposition antigénique dans un délai incompatible avec l'intervention des lymphocytes T CD4⁺ (206). L'absence d'interaction antigène-spécifique avec les lymphocytes « helper » explique probablement pourquoi il n'y a pas de génération de cellules mémoires dans les suites d'une activation des lymphocytes B-1 (207) alors que c'est une caractéristique habituelle de la mise en jeu des lymphocytes B et T. Les cellules B-1 sont cruciales dans la défense contre les infections à *S. pneumoniae* chez la souris car elles sécrètent rapidement des anticorps protecteurs anti-phosphocholine sans nécessiter d'interaction antigénique avec les cellules T (208).

Très récemment, une autre sous-population de lymphocytes B de type inné a été identifiée. Ces cellules se caractérisent par l'expression de TLR4 et par leur capacité à proliférer et à sécréter de très large quantité de GM-CSF en réponse à une infection microbienne ou à une stimulation par du LPS. Rauch et coll. ont appelé ces cellules les cellules B activatrices de la réponse innée (« Innate response activator B cells ») (209). Ces cellules dérivent des lymphocytes B-1 et semblent jouer un rôle déterminant dans la réponse anti-infectieuse. En utilisant un modèle murin de double chimère permettant d'obtenir des animaux possédant des leucocytes normaux mais des lymphocytes B incapables de sécréter du GM-CSF, les auteurs ont observé que ces souris présentaient après une LPC, une diminution de la clairance bactérienne, une diminution des capacités phagocytaires de leur PNN et une réponse inflammatoire majeure se traduisant par une augmentation de la mortalité par rapport aux animaux contrôles. Cette découverte devrait permettre d'important progrès dans la compréhension des rôles des lymphocytes B de type inné dans la réponse anti-infectieuse en particulier lors d'infections des séreuses.

Les lymphocytes $\gamma\delta$

La population de lymphocytes de type inné la plus abondante dans l'organisme est la sous-population de lymphocytes T exprimant un TCR composé d'une chaîne γ et d'une

chaîne δ . Ces lymphocytes $\gamma\delta$ sont divisés en deux principales composantes: les lymphocytes $\gamma\delta$ trouvés dans les tissus lymphoïdes, peu nombreux, qui expriment une grande variété de TCR similaire aux lymphocytes $\alpha\beta$, et les lymphocytes $\gamma\delta$ qui résident dans les épithélium, principalement cutanés, gynécologiques et digestifs, et qui expriment une variabilité restreinte de TCR. Comme les lymphocytes B-1, les lymphocytes $\gamma\delta$ semblent ne pas circuler au sein des organes lymphoïdes secondaires. Ils ont la propriété de reconnaître directement des ligands antigéniques sans interaction avec une molécule de CMH (210). Ces ligands potentiels ne sont pas toujours des antigènes du non-soi mais aussi des antigènes exprimés par les cellules épithéliales en condition d'agression (protéines de stress telles les « heat-shock », le CMH-Ib ; phospholipides atypiques...). Le rôle des lymphocytes $\gamma\delta$ dans la réponse anti-infectieuse est complexe. Chez la souris, leur fonction semble dépendre du délai par rapport au début de l'infection et du clone particulier de LT $\gamma\delta$ étudié. A la phase précoce, les lymphocytes $\gamma\delta$ sont recrutés en quelques heures au site de l'infection ou ils participent à la réponse pro-inflammatoire et à la clairance du pathogène en sécrétant principalement de l'INF- γ et de l'IL-17 (211). Leur implication dans la réponse anti-infectieuse a été démontrée pour des bactéries, des virus et des parasites (212). A une phase plus tardive de l'infection, une deuxième vague de lymphocytes $\gamma\delta$ (notamment les clones V γ 5) sont recrutés au site de l'infection au moment de l'éradication du pathogène. Ils modulent alors une réponse de type anti-inflammatoire associant une sécrétion d'IL-10 et de keratinocyte growth-factor et participent à la réparation du tissu lésé (213). Cette dualité de fonction rend complexe l'analyse globale de leur rôle, en effet, il dépend des clones impliqués, du délai par rapport à l'infection, de l'importance de l'inoculum, du site et du mode d'infection (212). Chez l'homme une étude a retrouvé une diminution de la quantité circulante de ces cellules chez les patients septiques (214) mais ce phénomène est également observé chez les patients brûlés sans agression septique (215). Globalement, l'ensemble de ces données suggère que les

lymphocytes $\gamma\delta$ sont impliqués à la phase tardive dans la cicatrisation des lésions tissulaires qu'elles soient d'origine infectieuses ou non infectieuses (216).

Les lymphocytes NKT

Il existe aussi des LT $\alpha\beta$ qui présentent un phénotype caractéristique de lymphocytes de type innés. Les lymphocytes T tueurs naturels invariants ou « invariant Natural Killer T-cells » (iNKT) se trouvent dans le thymus et les organes lymphoïdes y compris les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT). Ils expriment de façon caractéristique la molécule NK1.1 et une chaîne α invariante du TCR ($V\alpha 24-J\alpha 18$ chez l'homme, $V\alpha 14-J\alpha 28$ chez la souris) combinée avec seulement 3 chaînes β possibles (217). Ce TCR est capable de reconnaître des antigènes glycolipidiques présentés par une molécule analogue au CMH-I appelée CD1d. L'interaction entre le TCR des iNKT et la molécule CD1d entraîne une sécrétion rapide de cytokines, soit de profil Th-2 en particulier l'IL-4 et l'IL-10, soit de type Th-1 essentiellement l'IFN- γ , ce qui confère à ces cellules des propriétés régulatrices de la réponse lymphocytaire T (217). L'implication potentielle des iNKT dans la réponse anti-infectieuse est essentiellement basée sur des analyses *ex vivo*. En effet, il a été montré que l'activation des iNKT survenait lorsque la molécule CD1d présentait certains motifs moléculaires glycolipidiques de certains pathogènes tels *Sphingomonas sp.* (218, 219), *Erlichia muris* (218), or *Borrelia burgdoferi* (220, 221) et plus récemment d'un glycolipide de *S. pneumoniae* (221). Il existe une deuxième voie d'activation des iNKT, indirecte et non spécifique d'antigène, par le biais des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IL-18 (217). Au-delà de la démonstration de l'activation, directe ou indirecte, des iNKT par une invasion microbienne, leur fonction dans la réponse anti-infectieuse n'est pas claire. Le seul rôle mis en évidence dans les articles précédemment cité est de faciliter la clairance bactérienne pulmonaire de *S. pneumoniae* mais sans données disponibles sur la réponse inflammatoire pulmonaire ou sur la survie des animaux (221). Dans le sepsis polymicrobien induit par LPC,

les iNKT ont, selon les équipes, soit un rôle protecteur soit un rôle délétère (222) enfin il faut noter que la grande majorité des données proviennent des modèles murins où les iNKT sont abondants (quelques % des lymphocytes circulants) alors que ces cellules sont très rares parmi les lymphocytes circulants chez l'homme (223).

Les lymphocytes MAIT

Découvertes au début des années 90, les cellules T invariantes associées aux muqueuses ou « Mucosal associated invariant T-cells » (MAIT) expriment également une chaîne α invariante: la chaîne V α 7.2-J α 33 chez l'homme et V α 19-J α 33 chez la souris. Les MAIT peuvent exprimer la molécule CD8 ou être « double négative » CD4⁻ CD8⁻. Elles sont très abondantes chez l'homme (1 à 8% des lymphocytes circulants) mais très minoritaires chez la souris (224). Leur activation est restreinte par la molécule MR-1 analogue du CMH-I et elles sont parfois décrites comme l'équivalent humain des iNKT murins (223). Elles résident principalement dans la muqueuse intestinale au sein des MALT et au sein du parenchyme hépatique. Leur accumulation survient très rapidement après la naissance et nécessite la présence d'une flore bactérienne intestinale (225). Elles présentent un phénotype de lymphocytes effecteurs mémoire et sont caractérisées par une expansion oligoclonale malgré leur nombre important. Elles expriment fortement les récepteurs CCR6 et CXCR6 qui sont associés à la migration tissulaire digestive, mais pas le récepteur CCR7 qui permet l'adressage des lymphocytes aux ganglions. Elles expriment également le récepteur de type NK CD161 sans que la fonction de cette molécule soit élucidée (226). Récemment le groupe d'O Lantz a montré que les MAIT étaient activés par des CPA préalablement exposées à des bactéries vivantes ou à des levures à l'exception notable des *streptococcaceae* et de *listeria sp.* (227). La nature du ligand qui permet l'activation des MAIT par les CPA a récemment été identifiée. Il s'agit de métabolites de certaines vitamines B spécifiquement générés par le catabolisme bactérien ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle anti-infectieux des MAIT (228).

L'implication des MAIT dans la réponse anti-infectieuse a été suggérée dans des modèles expérimentaux ou d'une part la surexpression transgénique des MAIT (souris knock-in V α 19) rend les animaux résistants à un challenge intra-péritonéal d'*E. coli* (227), et ou d'autre part, l'invalidation du gène MR-1 augmente la susceptibilité des animaux à une infection à *K. pneumoniae* (229). Chez l'homme, les MAIT semblent impliqués dans la réponse anti-tuberculeuse une étude ayant retrouvé des MAIT ayant une réactivité spécifique contre les antigènes de *M. tuberculosis* dans le sang des patients anciennement exposés au bacille de Koch et montrant qu'en cas de tuberculose active, ces cellules étaient retrouvées au sein des lésions pulmonaires (230).

Ainsi il semble que parmi les lymphocytes de type innés les MAIT aient un rôle dans l'immunité anti-bactérienne chez l'homme bien que les études proviennent d'un nombre limité de groupe de recherche et demandent à être confirmée en pathologie humaine.

Chapitre 3:

Physiopathologie du sepsis :
du paradigme initial de la réponse inflammatoire
exacerbée à la dysrégulation du système immunitaire

Le sepsis est la résultante d'interactions complexes entre un pathogène et la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte. Dans la conception classique du sepsis, l'intensité de la réponse inflammatoire déclenchée par l'invasion du pathogène est considérée comme la principale responsable des défaillances d'organes et de la mortalité au cours des infections graves. Cependant, les observations cliniques chez les patients septiques et les progrès dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis permettent maintenant de proposer un modèle alternatif. D'une part, il est apparu que le pathogène tenait également un rôle fondamental dans l'immuno-pathologie du sepsis sévère. D'autre part, la réponse immune ne peut pas se résumer à une inflammation exacerbée car elle inclue aussi une composante anti-inflammatoire dont le rôle apparaît de plus en plus important et qui traduit une dysrégulation profonde du système immunitaire.

3-1 Le paradigme initial : une réponse inflammatoire exacerbée

Lors d'une invasion microbienne, l'interaction hôte-pathogène induit une réaction inflammatoire locale au niveau de l'organe infecté, dont le but est d'éradiquer le pathogène et de prévenir la dissémination systémique de l'infection (cf chapitre 2). La reconnaissance du pathogène par les cellules de l'immunité innée induit la synthèse des médiateurs de l'inflammation. Ces molécules peuvent être individualisées en fonction de leurs propriétés biochimiques : les amines vasoactives (histamine, sérotonine), les peptides vasoactifs (substance P, produits de dégradation de la fibrine), les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines, les médiateurs lipidiques (PAF, eicosanoids), les anaphylatoxines du complément (C3a et C5a) et la NO-synthase inductible (iNOS) qui augmente la production du monoxyde d'azote (NO), régulateur essentiel du tonus vasculaire. Ces différents médiateurs contribuent à l'initiation et à l'entretien de la réaction inflammatoire: ils augmentent le débit sanguin local, permettent l'adhésion, la diapédèse et le chimiotactisme des polynucléaires

neutrophiles et favorisent les microthromboses vasculaires. Parallèlement, le système immunitaire et le système neuroendocrine (axe hypothalamus-hypophyse-surrénale, systèmes nerveux sympathique et parasympathique) sont capables de contrôler le processus inflammatoire local par la production coordonnée de médiateurs anti-inflammatoires comme certains neuromédiateurs (Vasoactive intestinal peptide, catécholamines β -agonistes, acétylcholine via la stimulation des récepteurs nicotinergiques) (231).

Dans certaines infections, l'importance de l'inoculum bactérien, la virulence particulière du pathogène ou ses capacités d'échappement à la réponse immunitaire, ou bien encore des facteurs liés à l'hôte, limitent l'efficacité de la réponse inflammatoire initiale pour éradiquer le pathogène. La stimulation de la réaction inflammatoire se pérennise. Le dépassement des mécanismes anti-inflammatoires compensateurs ainsi que des phénomènes d'ischémie-reperfusion conduisent à une dérégulation et une amplification de la réaction inflammatoire de l'hôte. Le système de la coagulation joue un rôle majeur dans l'amplification de la réponse inflammatoire et dans la génération des défaillances d'organes. L'expression du facteur tissulaire à la surface des cellules endothéliales et des monocytes entraîne une activation de la coagulation et une inhibition de la fibrinolyse par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène. Cela favorise la formation de microthromboses qui peuvent se traduire par une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (232). La formation de thromboses microvasculaires diffuses participe à l'altération de la perfusion tissulaire et peut induire une ischémie tissulaire et générer des phénomènes d'ischémie-reperfusion. Ceux-ci s'accompagnent d'une production de radicaux libres comme l'anion superoxyde qui participe à l'activité antimicrobienne mais qui possède également des propriétés cytotoxiques en altérant les protéines et acides gras membranaires. Le NO produit par la iNOS à partir de l'arginine entraîne une vasodilatation artérielle généralisée. En se combinant avec l'anion superoxyde, ils forment du peroxynitrite, substance hautement oxydante qui participe aux dommages

tissulaires. Les conséquences sont d'abord locales avec une aggravation des lésions tissulaires et de la dysfonction de l'organe dans lequel se situe le foyer infectieux primitif. Secondairement, la décompartmentalisation de la réponse inflammatoire a des conséquences systémiques et induit la défaillance d'organes initialement non infectés qui aboutissent à une défaillance multi-viscérale incontrôlable au-delà de toute ressource thérapeutique.

Cette description caricaturale est effectivement observée dans certaines situations cliniques rares et prototypiques comme le purpura fulminans méningococcique, cependant, cette pathologie est loin d'être représentative de la présentation clinique habituelle du choc septique. Les mécanismes physiopathologiques tels qu'ils sont rapportés ci dessus prennent peu en compte le rôle propre du pathogène dans la génération des défaillances d'organes. D'autre part, si une réponse inflammatoire dérégulée contribue certainement au développement initial des défaillances d'organes, la plupart des patients survivent maintenant à la phase initiale avec une amélioration des défaillances d'organes. Ces constatations cliniques suggèrent que des mécanismes physiopathologiques alternatifs contribuent à la mortalité liée au sepsis.

3-2 Modulation de la réponse inflammatoire par les agents pathogènes

Les maladies infectieuses résultent de la rencontre entre 2 organismes vivants. Les caractéristiques de l'interaction entre l'hôte et le pathogène déterminent l'expression de la maladie : éradication ou persistance, commensalisme ou pathogénicité, colonisation ou infection, symptomatologie chronique ou aigue... Les Dr Casadevall et Pirofski, au milieu des années 1990 ont intégré cette double variabilité en développant le concept de « Damage-response Framework » dans lequel ils postulaient que l'expression clinique de la maladie infectieuse notamment sa gravité était en rapport avec les dommages tissulaires de l'hôte. Deux éléments pouvaient être à l'origine de ces dommages : le pathogène notamment par l'intermédiaire de ses facteurs de virulence, et/ou les effecteurs de la réponse immunitaire.

Cette théorie permet de comprendre que la gravité des infections peut-être liée à une réponse immune insuffisante de l'hôte, les dommages tissulaires étant causés par le pathogène, ou à une réponse immune excessive entraînant des dommages tissulaires par les effecteurs antibactériens comme dans le paradigme classique. Cette prise en compte de la pathogénicité propre des micro-organismes permet par exemple d'expliquer la gravité supérieure des infections bactériennes chez le neutropénique. De fait, les espèces bactériennes n'ont pas toute la même pathogénicité et au sein d'une même espèce bactérienne, certaines souches possèdent des caractéristiques associées à une plus grande virulence. Les molécules bactériennes qui sous-tendent ces propriétés ont été appelées facteurs de virulence et ont fait l'objet de nombreuses études. Les facteurs de virulence peuvent contribuer directement aux lésions tissulaires par cytotoxicité, ils peuvent également altérer les défenses de l'hôte ou bien moduler la réaction inflammatoire. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* exprime de nombreux facteurs de virulence qui favorisent sa pathogénicité et lui permettent de pervertir les défenses immunitaires (233). Des composants pariétaux (flagelle et pili) permettent l'adhésion aux cellules épithéliales, des protéines extracellulaires (protéases, élastases...) dégradent la matrice extracellulaire et facilitent l'invasion tissulaire ce qui permet à la bactérie d'échapper aux facteurs de l'immunité humorale. Par ailleurs, le transfert intracellulaire de toxines (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) au sein de la cellule de l'hôte par un système de sécrétion de type III (SSTT) induit la transduction de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les cellules épithéliales puis leur apoptose. Ces phénomènes altèrent l'imperméabilité de l'épithélium respiratoire et favorisent son franchissement par les bactéries. D'autres facteurs solubles extracellulaires agissent directement sur les cellules de l'immunité, les hémolysines et pyocyanines induisent l'apoptose des macrophages et neutrophiles recrutés sur le site de l'infection alors que l'exotoxine A inhibe la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T qui présente alors un phénotype anergique (233). L'impact clinique de ces facteurs de virulence

est bien démontré, par exemple la présence d'un SSTT est associée à une réaction inflammatoire pulmonaire intense et une diminution de la clairance du pathogène (234) à une décompartimentalisation de la réponse inflammatoire (235) et chez l'homme, à une incapacité à éradiquer *P. aeruginosa* malgré une antibiothérapie efficace (236). Ce type de facteur de virulence constitue une cible thérapeutique séduisante : l'administration d'anticorps monoclonaux inhibant un composant majeur du SSTT chez des patients ventilés mécaniquement et colonisés à *P. aeruginosa* a donné des résultats prometteurs dans un essai de phase 2 (237).

D'autres facteurs de virulence microbiens influencent directement l'intensité de la réponse inflammatoire et peuvent contribuer à son exacerbation. Comme nous l'avons vu au chapitre 2, le LPS, libéré par la lyse de bacilles Gram négatif (BGN), peut majorer la réponse inflammatoire systémique, en présence d'un récepteur TLR4 fonctionnel. Inversement l'absence de ce récepteur entraîne une hypersusceptibilité aux infections à BGN. Ceci illustre la différence entre une infection par une bactérie vivante et l'administration d'un motif moléculaire comme le LPS. Elle illustre la théorie du « Damage response Framework » : lors de l'administration d'une molécule bactérienne isolée, les dommages tissulaires proviennent de la réponse inflammatoire de l'hôte. Inversement lors d'une infection bactérienne, si l'hôte n'est pas capable d'organiser une réponse immune efficace, les bactéries vivantes entraînent des dommages tissulaires potentiellement létaux. Un autre exemple de modulation de la réponse inflammatoire est celui des super-antigènes. Ces molécules sont des toxines bactériennes sécrétées par certains streptocoques et staphylocoques qui ont la propriété d'activer les lymphocytes T sans être restreinte par la reconnaissance spécifique du complexe CMH-II:peptide antigénique. En effet ces super-antigènes se fixent d'une part sur la molécule du CMH-II en dehors du site de présentation du peptide et d'autre part sur les domaines variables d'une chaîne du TCR (en général la chaîne bêta). L'interaction entre le TCR et le

CMH qui en résulte est donc non spécifique de l'antigène, et active de ce fait un très grand nombre de clones lymphocytaires ce qui aboutit à la production dérégulée de cytokines pro-inflammatoires entraînant un syndrome de choc toxique particulièrement sévère (238). Ces manifestations sont à rapprocher de l'« orage cytokinique » qui a été observé chez des volontaires sains après administration d'un anticorps anti-CD28 qui a entraîné l'activation non contrôlée des lymphocytes T aboutissant au développement de défaillances d'organe (239). Ces observations montrent qu'il existe des interactions dynamiques et complexes entre les pathogènes et les mécanismes de défense de l'hôte qui aboutissent à des profondes modifications du système immunitaire.

3-3 Dysrégulation de la réponse immune

Les infections sévères se caractérisent par une réponse inflammatoire exacerbée, en partie induite par les pathogènes eux-mêmes, qui suggère une activation insuffisamment régulée du système immunitaire. Dans ce schéma, la dérégulation vers un état « hyper » inflammatoire serait compensée secondairement par une réponse anti-inflammatoire compensatrice (CARS) qui permettrait le retour à une physiologie « normale ». Le CARS, observée de longue date (240), était initialement considérée comme une réponse adaptée du système immunitaire faisant suite à la réponse pro-inflammatoire. En fait, il est plus probable que la réponse anti-inflammatoire s'intègre comme une composante en soi de la réponse d'un organisme à une agression. Ainsi, dans une étude prospective et multicentrique, Xiao et coll ont analysé le transcriptome des leucocytes chez 167 patients admis pour traumatisme sévère à leur admission en réanimation et régulièrement au cours des 28 jours suivants (241). Ils ont observé les éléments suivants : la réponse transcriptomique initiale était similaire quelque soit la sévérité du traumatisme et maximale dès le premier prélèvement. Elle se caractérisait par une hausse de la transcription de gènes impliqués dans l'immunité innée : récepteurs des pathogènes et molécules associées et cytokines pro- mais aussi anti-inflammatoire. De façon

concomitante, il existait une répression de la transcription de gènes principalement impliqués dans la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T aboutissant ainsi à une altération de la régulation du système immunitaire

Par ailleurs, les auteurs ont comparé l'évolution du transcriptome entre les patients ayant des suites simples et ceux dont le séjour en réanimation était « compliqué » par la persistance des défaillances d'organe. Les transcriptomes de ces 2 groupes de patients restaient qualitativement proches mais les patients avec une évolution non compliquée présentaient une régression des modifications initiales alors que chez les patients ayant une évolution compliquée, les changements transcriptomiques initiaux restaient soutenus dans le temps. Cette étude suggère un nouveau paradigme d'une dysrégulation immunitaire soutenue à l'origine de la physiopathologie des états inflammatoires aigus (**figure 9**). Il faut souligner que cette étude incluait des patients ne présentant pas d'infection mais une pathologie assimilable à une agression inflammatoire « pure ».

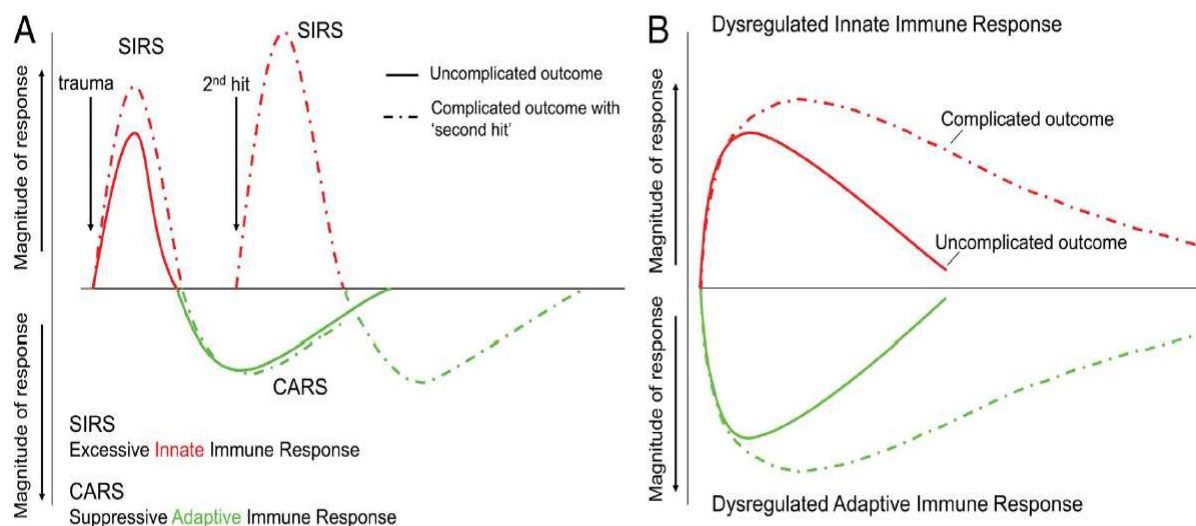


Figure 9: Evolution des conceptions sur la réponse inflammatoire. Dans le modèle classique (panel A), la réponse pro-inflammatoire (SIRS) génère une réponse anti-inflammatoire compensatrice (CARS). Le nouveau paradigme (B) associe la stimulation de la réponse immunitaire innée (pro- et anti-inflammatoire) à l'inhibition du système adaptatif aboutissant à une dysrégulation immunitaire d'autant plus prolongée que l'évolution est compliquée. D'après Xiao et al. (241)

Dans le cadre des infections graves, les transformations que subit le système immunitaire sont encore plus complexes, et nous nous attacherons à les détailler dans le prochain chapitre.

Chapitre 4:

L'immunodépression post-infectieuse :
altérations du système immunitaire et apports des
modèles expérimentaux

Comme nous l'avons préalablement discuté (cf. chapitre 1), il apparaît maintenant clairement que des patients préalablement considérés comme immunocompétents et ayant survécu à la phase initiale d'un choc septique, présentent des manifestations cliniques évocatrices d'une immunodépression acquise. Ces observations cliniques sont corroborées par plusieurs études translationnelles et expérimentales montrant que les infections bactériennes sévères entraînent de profondes altérations dans l'homéostasie des systèmes immunitaires inné et adaptatif.

4-1 Dysfonctions immunitaires induites par le sepsis

Pour des raisons méthodologiques évidentes, la plupart des études physiopathologiques humaines se sont focalisées sur les cellules du compartiment sanguin. Cependant quelques études essentiellement autopsiques ont permis d'appréhender également les atteintes des organes lymphoïdes secondaires. Les limites de ces explorations chez l'homme ont justifié le recours à l'expérimentation animale et la modélisation de ces situations cliniques afin d'investiguer les conséquences de l'immunodépression post-infectieuse au niveau tissulaire ainsi que les mécanismes régulateurs impliqués dans ces phénomènes.

La réponse anti-inflammatoire systémique

L'invasion bactérienne entraîne une réaction inflammatoire au sein de l'organe infecté qui a pour but d'éradiquer le pathogène et de limiter les dommages tissulaires. La décompartimentalisation de ce phénomène local est responsable du développement d'une réponse inflammatoire systémique. A celle-ci s'associe rapidement une réponse anti-inflammatoire soutenue, parfois dénommée CARS (Compensatory Anti-inflammatory response syndrome) (240, 242). Cette réponse anti-inflammatoire systémique se caractérise

par la synthèse de médiateurs anti-inflammatoires, dont l'IL-10, et des inhibiteurs de cytokines pro-inflammatoires comme le récepteur soluble du TNF- α ou le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1ra). L'IL-10 représente la cytokine anti-inflammatoire prototypique douée d'effets pléiotropiques sur les cellules immunitaires. Elle inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, la maturation des cellules dendritiques (CDs), oriente la réponse lymphocytaire vers un profil cytokinique de type Th-2 et induit des sous-populations régulatrices de lymphocytes T (243-245). Au cours des infections, l'IL-10 permettrait ainsi de prévenir les lésions tissulaires immunopathologiques de l'hôte, mais parfois au prix d'une altération des mécanismes d'éradication du pathogène (246). Dans les modèles animaux de sepsis, la cinétique de production des médiateurs anti-inflammatoires est retardée (12-24h après le début du sepsis) par rapport au pic de concentration sérique des cytokines pro-inflammatoires (2-6h), et est soutenue sur plusieurs jours (133, 247). Chez les patients septiques, les concentrations de médiateurs anti-inflammatoires sont déjà élevées au moment de l'admission à l'hôpital, témoignant probablement de la durée écoulée depuis l'invasion microbienne dont le moment précis est souvent impossible à déterminer. Chez l'homme, l'amplitude de la production d'IL-10 a été corrélée à la sévérité et à la mortalité du sepsis (138, 248). Des travaux récents suggèrent que les deux types de réponse sont initiés de manière concomitante en réponse à un challenge inflammatoire (cf chapitre 3).

Désactivation des monocytes

Au cours du sepsis sévère, les monocytes subissent une véritable désactivation fonctionnelle dont l'anomalie la plus caractéristique est la diminution d'expression membranaire de HLA-DR (249, 250). Celle-ci a été rapportée à divers mécanismes incluant une régulation transcriptionnelle négative par le cortisol (251), une diminution de l'expression du récepteur membranaire au GM-CSF (252), ou la séquestration intracytoplasmique de HLA-DR induite par l'IL-10 (253). La diminution d'expression de l'appareil de présentation

de l'antigène à la surface des monocytes a des conséquences fonctionnelles directes sur les lymphocytes T en favorisant une réponse de type anergique ou régulatrice (254). En parallèle, les monocytes provenant de patients septiques présentent une altération de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à une stimulation *in vitro* par du LPS ou du CD40-Ligand (255) alors que la production d'IL-10 est maintenue ou augmentée (250, 256). La régulation de ces phénomènes implique le recrutement préférentiel de la forme homodimérique inhibitrice p50p50 du facteur de transcription NF- κ B (257, 258) ou l'expression de régulateurs négatifs (IRAK-M, MyD88s, SIGIRR) des voies de signalisation dépendantes de Toll-like Receptor (TLR)-4 (259, 260). Un rôle particulier est sans doute porté par les récepteurs de la famille TAM (Tyro-3, Axl et Mer tyrosine kinase) et en particulier par la protéine MerTK. Ce récepteur est exprimé après la stimulation des voies des TLRs et permet l'atténuation de la réponse au LPS chez la souris (261). Une étude récente a mis en évidence chez des patients septiques une surexpression de MerTK de manière corrélée au pronostic. De façon intéressante, l'hyperexpression de MerTK pouvait être reproduite *ex vivo* par l'exposition de monocytes de donneur sains au serum des patients septiques, suggérant la participation d'un facteur soluble (262). Enfin, le sepsis entraîne une diminution d'expression du récepteur de chimiokine CX3CR1 impliqué dans les phénomènes d'adhésion et de recrutement tissulaire (263). La désactivation monocyttaire apparaît ainsi comme un mécanisme rapidement opérationnel de régulation négative de la réaction inflammatoire au cours des états infectieux sévères.

La diminution de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes est mesurable de manière simple et reproductible en cytométrie de flux, et plusieurs études humaines ont ainsi permis de préciser les conséquences pronostiques de la désactivation des monocytes dans les états septiques sévères (249, 251, 264-266). L'amplitude et la durée de la diminution d'expression de HLA-DR ont été corrélées au nombre et à l'intensité des défaillances

d'organes. De plus, la persistance d'une faible expression de HLA-DR (<30% des monocytes) a été identifiée comme un facteur pronostique indépendant de mortalité et comme un facteur de risque indépendant d'infections nosocomiales (266). La désactivation des monocytes évaluée par l'expression de la molécule HLA-DR constitue ainsi à l'heure actuelle le marqueur le plus robuste d'immunodépression induite par le sepsis chez les patients de réanimation.

Défaut de migration des polynucléaires neutrophiles

A l'instar des monocytes, les polynucléaires neutrophiles (PNN) subissent des modifications fonctionnelles qui peuvent participer à une susceptibilité accrue aux infections secondaires au cours du sepsis (267). Chez des volontaires sains, un challenge par endotoxine (LPS) induit rapidement une diminution de la capacité de production de chimiokines des PNN en réponse à un stimulus bactérien (268). Cependant, le sepsis semble principalement affecter les capacités de migration tissulaire des PNN, en rapport avec une diminution d'expression membranaire du récepteur de chimiokines CXCR-2 (269). L'altération du chimiotactisme des PNN *ex vivo* a été corrélée à la mortalité des patients septiques (270), de même, la diminution de la migration des PNN au site infecté est un facteur important de surmortalité chez l'animal (271, 272). De manière intéressante, l'altération de clairance bactérienne caractéristique de certains modèles de pneumonies secondaires chez des animaux septiques a été rapportée à un défaut de recrutement pulmonaire des PNN (273-275).

Altération de l'homéostasie des cellules dendritiques

Comme nous l'avons développé au chapitre 3 de cette introduction, les CD jouent un rôle unique à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative et pourraient ainsi être impliquées dans les mécanismes de régulation de l'immunodépression post-infectieuse. Plusieurs travaux récents, essentiellement réalisés chez la souris, mais qui semblent

corroborés par des études humaines, ont rapporté une déplétion précoce et prolongée des CD associée à des anomalies fonctionnelles des cellules résiduelles au cours des différentes phases du sepsis. Chez la souris, le sepsis polymicrobien induit une apoptose des CD au sein des organes lymphoïdes secondaires (119, 276-278), ainsi que dans les organes situés à distance du foyer infectieux initial (278, 279). La fonction des CD est aussi durablement affectée, y compris après repopulation des organes lymphoïdes secondaires (279, 280). Les CD isolées de souris septiques démontrent ainsi une altération prolongée de production d'IL-12 en rapport avec des modifications épigénétiques alors que la production d'IL-10 est maintenue voire augmentée (279, 281). Ceci s'accompagne d'une diminution des capacités de stimulation des lymphocytes T en rapport avec une diminution de l'expression des molécules du CMH II et de costimulation qui forment l'appareil de présentation de l'antigène des molécules du CMH II et de costimulation (282). Ce phénotype se rapproche ainsi de celui de CD dites régulatrices car induisant préférentiellement l'expansion de lymphocytes T anergiques ou régulateurs (283).

Chez l'homme, l'étude des CD est limitée par leur localisation majoritairement tissulaire. Cependant une étude anatomopathologique a rapporté une déplétion des CD dans la rate de patients septiques mais pas dans des rates obtenues par splénectomie pour traumatisme splénique (284). Dans le sang, les CD représentent une fraction minime (0.2 à 0.5%) des leucocytes, mais leur quantification est récemment devenue possible grâce aux progrès de la cytométrie en flux (285). Au cours du choc septique, deux études ont montré qu'il existait une diminution profonde des CD circulantes (286, 287) cependant l'évolution de cette déplétion au cours du temps et leur possible implication dans la survenue d'infections secondaires n'ont pas été investiguées.

Apoptose et modifications fonctionnelles des lymphocytes

Les lymphocytes subissent de profondes modifications quantitatives et fonctionnelles au cours du sepsis. La survenue d'une apoptose lymphocytaire est une manifestation immunopathologique caractéristique du sepsis. L'apoptose des lymphocytes T et B a été observée dans la rate de patients septiques et est reflétée par une lymphopénie dont la profondeur est corrélée à la sévérité des défaillances d'organes, et dont la persistance est associée au décès (288 , 289 , 290). Les conséquences de l'apoptose lymphocytaire sont multiples.

La diminution du nombre de lymphocytes altère la réponse de l'hôte au sepsis polymicrobien comme en atteste la susceptibilité accrue des souris Rag1^{-/-} déficientes en lymphocytes T et B matures (291) . Les lymphocytes contribuent en effet de manière précoce à la réaction inflammatoire et à la clairance bactérienne (292, 293). De nombreuses stratégies visant à inhiber l'apoptose lymphocytaire ont été associées à une amélioration de la survie chez des souris soumises à un sepsis polymicrobien. Parmi ces stratégies, citons la surexpression lymphocytaire de protéines anti-apoptotiques; l'hyperactivation de NF- κ B dans les lymphocytes T, la neutralisation de protéines ou d'effecteurs (caspases) pro-apoptotiques, l'administration de substances favorisant la survie cellulaire telle que l'IL-7 ou l'IL-15 ou encore l'expression intrathymique d'IL-10 par le biais d'un vecteur adénoviral (294).

L'apoptose des lymphocytes T induite par le sepsis modifie profondément la répartition des sous-populations lymphocytaires. En raison d'une déplétion préférentielle des lymphocytes CD4⁺CD25⁻, la proportion relative des lymphocytes T régulateurs (Tregs) CD4⁺CD25⁺ augmente au cours du choc septique chez l'homme ainsi que chez l'animal (172, 295 , 296). Les mécanismes expliquant la préservation des Tregs sont complexes et incluent une plus grande résistance à l'apoptose, mais aussi une induction de Tregs par des CD ayant acquis un phénotype régulateur au contact de CD apoptotiques (297). L'augmentation

relative des Tregs pourrait contribuer à la réponse anergique des patients septiques aux tests d'hypersensibilité retardée (298), et a été impliquée dans la susceptibilité de souris septiques à une pneumonie secondaire à *Legionella pneumophila* (299).

En outre l'apoptose joue en elle-même un rôle immunomodulateur essentiel. Dans un travail remarquable, Hotchkiss et coll. ont mis en évidence les rôles respectifs de l'apoptose et de la nécrose sur la modulation de la réponse immunitaire au cours du sepsis polymicrobien murin. Ainsi, le transfert de cellules apoptotiques (splénocytes irradiés) est associé à une diminution de la production d'IFN- γ par des splénocytes de l'hôte et à une diminution de la survie. A l'inverse, le transfert de cellules nécrotiques (splénocytes congelés puis décongelés) permet d'augmenter la production d'IFN- γ , augmente la clairance bactérienne et finalement améliore la survie des animaux (300). Par ailleurs, les cellules apoptotiques préviennent la maturation des CD et favorisent la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β (79, 301).

Les lymphocytes résiduels démontrent des modifications fonctionnelles importantes. Au cours du sepsis, la réponse lymphocytaire T évolue rapidement d'une réponse initiale de type Th-1 vers une réponse Th-2 associant une diminution de la production d'IFN- γ et une augmentation de la production d'IL-10 et d'IL-4 (302-305). Dans une étude autopsique, les lymphocytes CD4⁺ spléniques de patients décédés de sepsis démontraient une diminution de l'expression de la molécule de co-activation CD28 au dépend d'une augmentation de l'expression de la molécule inhibitrice PD-1 (306). Cette observation a été confirmée sur les lymphocytes circulants de patients présentant un choc septique (307). Enfin, une étude très récente suggère qu'il existe une réduction drastique mais transitoire de la diversité du répertoire des lymphocytes T circulants à la phase précoce du choc septique, dont les implications fonctionnelles et les conséquences cliniques demandent à être précisées.

Les cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives représentent une population hétérogène de cellules immatures exprimant des marqueurs de différenciation myéloïdes et douées de propriétés immunosuppressives par inhibition de l'activation des lymphocytes T. A l'inverse de la plupart des cellules immunitaires, les cellules myéloïdes suppressives voient leur nombre augmenter de manière importante dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes secondaires au cours du sepsis (306, 308). Leur rôle physiologique au cours du sepsis et dans la susceptibilité aux infections secondaires reste à éclaircir.

4-2 Apport des modèles animaux

Les conséquences fonctionnelles des dysfonctions immunitaires acquises et les déterminants cellulaires et moléculaires qui régulent la profondeur de l'immunodépression post-infectieuse restent mal connus et difficiles à appréhender chez l'homme. Afin d'évaluer les caractéristiques de la réponse de l'hôte à une infection secondaire survenant au décours d'un état infectieux, des études expérimentales ont tenté de modéliser cette situation clinique fréquente par une double agression infectieuse séquentielle chez la souris. D'une manière générale, le sepsis initial altère profondément les mécanismes de défense systémiques et pulmonaires de l'hôte et rend les souris hautement susceptibles à une infection secondaire.

L'agression infectieuse primaire utilisée par l'immense majorité des équipes est la ligature ponction caecale (LPC) qui permet de provoquer une péritonite polymicrobienne. Ce modèle est incomparablement plus physiologique que l'injection d'endotoxine qui mime plus une agression inflammatoire « pure » sans infection microbienne. Au-delà de l'infection primaire, les conséquences du sepsis polymicrobien et du challenge endotoxinique sont radicalement différentes. Alors que le sepsis polymicrobien confère une susceptibilité accrue à des pneumonies secondaires bactériennes ou fongiques (cf infra), l'administration de LPS

s'accompagne à l'inverse d'une résistance aux infections secondaires liée une atténuation de la réaction inflammatoire et à une amélioration de la clairance bactérienne (309, 310). Ceci suggère d'une part que le choc endotoxinique induit par injection de LPS ne rend que très imparfaitement compte des anomalies immunitaires induites par le choc septique, et d'autre part que l'immunodépression induite par le sepsis polymicrobien ne peut simplement être assimilée à la tolérance au LPS.

Cependant, le modèle de LPC présente également des limites (311) : les conséquences de la LPC et sa gravité dépendent de la taille de la ligature et du diamètre du trou réalisé... Les protocoles de traitement post-opératoire ne sont pas codifiés: réhydratation, et antibiothérapie impactent ainsi sur la survie des animaux (282). Au total, selon la nature du protocole utilisé, la mortalité peut-être totale en quelques jours ou inversement nulle avec des conséquences sur le système immunitaire des souris qui peuvent être éminemment différentes. Par ailleurs, la LPC ne modélise que les infections polymicrobiennes péritonéales qui ne représentent qu'une partie des infections sévères humaines avec des caractéristiques propres (immunité locale du péritoine, absence de défaillance d'organe immédiatement causée par l'infection). Enfin, la LPC entraîne une infection persistante chez les souris qui ne sont pas réopérées pour le traitement de leur infection.

En ce qui concerne, l'agression infectieuse secondaire, la diversité des modèles étudiés est encore plus grande. Les modèles d'infection secondaire les plus couramment utilisés font appels à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* induite après un sepsis polymicrobien subléthal, qui mime ainsi une situation clinique fréquente en réanimation. Néanmoins, ces modèles diffèrent significativement entre eux, d'une part par la sévérité de l'infection initiale, et d'autre part par le délai entre infection primaire et pneumonie secondaire. La plupart des études ont utilisé un modèle d'infection pulmonaire précoce (24h), dans lequel les animaux septiques apparaissent hypersusceptibles à un inoculum bactérien non léthal chez les animaux

contrôles (273, 274, 312). Cette hypersusceptibilité est en rapport avec une réponse pulmonaire inadaptée associant un défaut de clairance du pathogène et un profil cytokinique anti-inflammatoire par diminution de la production de TNF- α et augmentation de la production d'IL-10. La désactivation transitoire du macrophage alvéolaire, responsable d'un défaut de phagocytose et d'une altération de la production de TNF- α et d'IL-12, semble être un élément critique de la réponse de l'hôte dans ce type d'infection pulmonaire précoce (243, 274, 313). Cependant, la concomitance des agressions primaires et secondaires pose la question de la pertinence de tels modèles. Notre équipe a développé un modèle alternatif dans lequel les animaux septiques demeuraient hypersusceptibles à l'infection pulmonaire secondaire à *P. aeruginosa* pendant au moins huit jours après la LPC. Cependant, il convient de souligner que les lésions pulmonaires semblaient alors liées à une réponse inflammatoire exacerbée plus qu'à un défaut de contrôle du pathogène (282).

Des modèles d'infections pulmonaires secondaires non bactériennes, moins pertinents cliniquement mais très informatifs sur le plan immunologique, ont permis d'appréhender le rôle critique de la balance Th-1/Th-2 dans les mécanismes de défense pulmonaire chez l'hôte septique. Ainsi, les animaux survivants d'une LPC sont particulièrement susceptibles à une infection pulmonaire par *Aspergillus fumigatus*, un champignon opportuniste habituellement inoffensif chez l'hôte immunocompétent (314, 315). Les animaux septiques apparaissent en effet incapables de produire une réponse pulmonaire Th-1 nécessaire à l'éradication de ce pathogène. En revanche, le sepsis polymicrobien induit une exacerbation de la réponse granulomateuse de type Th-2 lors de l'administration d'œufs du parasite plathelminthe *Schistosoma mansoni* (316). Nascimento et coll. ont développé un modèle de pneumonie secondaire à *L. pneumophila* dans lequel l'expansion des Treg induite par le sepsis était impliquée dans la susceptibilité des animaux (299). Pour autant, nous n'avons pas retrouvé un tel effet dans notre modèle de pneumonie secondaire à *P. aeruginosa* où la déplétion des Treg

à partir de la LPC ne modifiait en rien la survie des animaux (données non publiées). Enfin, signalons l'existence de modèles de candidémie secondaire (317) ou de pneumonie secondaire à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (318).

Ainsi, bien qu'ils soient nécessaires pour étudier rigoureusement les mécanismes de l'immunodépression post-infectieuse, les modèles animaux ne sont pas exempts de tout biais. Les données qu'ils permettent de générer doivent être considérées avec prudence et il faut se garder de généraliser des résultats obtenus dans un cadre précis d'infection primaire et secondaire.

Chapitre 5:

Objectifs du travail

La conception classique de la physiopathologie du sepsis repose sur le postulat que la réaction inflammatoire déclenchée par le pathogène est considérée comme la principale responsable des défaillances d'organes et de la mortalité. Les progrès réalisés dans le traitement des états septiques sévères, notamment par l'administration précoce d'antibiotiques et la prise en charge des défaillances d'organe en réanimation, ont modifié l'histoire naturelle de cette pathologie. En dehors de quelques situations cliniques particulières de réponse inflammatoire systémique intense et réfractaire (purpura fulminans, sepsis neutropénique, pneumococcie fulminante...), la grande majorité des patients actuellement admis en réanimation pour choc septique survivent à la phase initiale de la prise en charge. Au décours de l'épisode infectieux initial, l'évolution de ces patients est marquée par une susceptibilité marquée aux infections nosocomiales qui demeurent grevées d'une lourde morbi/mortalité. En dehors des facteurs de risque classiques liés aux soins comme l'utilisation de dispositifs médicaux invasifs et à l'hygiène hospitalière, le risque d'infections nosocomiales dépend également du statut immunitaire antérieur à l'admission en réanimation, et de la sévérité du tableau clinique. Chez l'homme, la mise en évidence formelle du rôle de l'immunodépression post-infectieuse dans le développement des infections nosocomiales est rendue difficile par ces multiples facteurs confondants. Néanmoins, plusieurs travaux cliniques récents suggèrent fortement une telle implication. Les modèles expérimentaux, qui permettent de s'affranchir de ces facteurs confondants, ont permis de faire la preuve de ce concept en démontrant que des animaux en phase post-septique sont hautement susceptibles à une agression infectieuse secondaire.

De façon concordante, les études cliniques et animales ont souligné la fugacité de la phase hyper-inflammatoire initiale, à laquelle succède rapidement une immunodépression complexe et prolongée associant des anomalies de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Les déterminants cellulaires et moléculaires responsables

de ces phénomènes doivent être identifiés afin d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques. Des données expérimentales suggèrent que les cellules dendritiques présentent des anomalies fonctionnelles induites par le sepsis qui sont associées à une susceptibilité particulière aux infections secondaires dans les modèles murins. Par ailleurs, au-delà des modifications post-septiques des lymphocytes T et B conventionnels, la place des lymphocytes T de type innés, dont le rôle dans la réponse anti-infectieuse a récemment été mis en évidence, n'a pas été étudiée dans le cadre de l'immunodépression post-infectieuse. Enfin, les mécanismes moléculaires qui régulent la survenue de cette immunodépression post-infectieuse sont mal compris, mais pourraient faire intervenir les voies de signalisation dépendantes des Toll-Like Recepteurs.

Notre travail de recherche est basé sur les hypothèses de travail suivantes :

1. Principales cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques sont impliquées dans la mise en place et la régulation des réponses immunitaires au cours du sepsis. De nombreux travaux expérimentaux soulignent l'importance des cellules dans la physiopathologie de l'immunodépression post-infectieuse des modèles murins. Dans un modèle murin d'aspergillose pulmonaire invasive en phase post-septique, l'administration intra-trachéale de cellules dendritiques générées à partir des précurseurs médullaires (bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs) de souris non-septiques permettait de restaurer une réponse pulmonaire de type Th-1 nécessaire à l'éradication du pathogène, et finalement d'améliorer la survie (315). Un effet bénéfique des BMDCs a également été rapporté dans un modèle de pneumonie secondaire à *P. aeruginosa*. Dans ce cas, le mécanisme d'action des cellules dendritiques exogènes a été rapporté à la modulation de la réponse inflammatoire pulmonaire mais sans amélioration de la clairance du pathogène (282). Ces données suggèrent que les cellules dendritiques ont des fonctions régulatrices cruciales dans l'organisation des défenses pulmonaires de l'hôte septique et que les anomalies

quantitatives et fonctionnelles des cellules dendritiques pourraient conférer une susceptibilité particulière aux infections secondaires. Néanmoins, les données en pathologie humaine sont limitées et les conséquences du sepsis sur les CDs ont essentiellement été investiguées dans des études autopsiques. De fait, l'impact du sepsis sur le nombre et les caractéristiques fonctionnelles des différentes sous-populations de cellules dendritiques circulantes *in vivo* et la relation avec la survenue d'infections nosocomiales n'ont pas été étudiés.

2. À l'interface entre immunité innée et immunité adaptative, les lymphocytes innés agissent dans des délais d'action « intermédiaires » de l'ordre de 12 à 24 heures et semblent jouer un rôle majeur dans l'organisation de la réponse immune. En particulier, la sous-population des lymphocytes MAIT a démontré une réactivité bactérienne spécifique et pourrait être impliquée dans la susceptibilité aux infections secondaires consécutive à l'immunodépression post-infectieuse.

3. Les TLRs jouent un rôle majeur dans l'initiation et dans la régulation de la réponse inflammatoire innée en réponse à une infection, mais sont également impliqués dans la maturation des cellules dendritiques permettant l'activation des lymphocytes T et l'organisation de la réponse immunitaire adaptative. Des arguments expérimentaux impliquent également les TLRs dans le développement de l'immunodépression post-septique. Au cours du sepsis polymicrobien, la signalisation dépendante des TLR2, TLR4 ou TLR9 contribue à l'apoptose des cellules dendritiques induite par le sepsis (115, 119), et la déficience de la molécule adaptatrice MyD88 commune à ces récepteurs inhibe l'apoptose lymphocytaire (319). Par ailleurs, la modulation de l'axe LPS/TLR4 semble jouer un rôle important dans le développement de l'immunodépression induite par le sepsis : la stimulation *ex vivo* par du LPS des monocytes et des cellules dendritiques issus d'hôtes septiques induit une sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et de façon intéressante, les protéines IRAK-M

et ST-2 qui sont des régulateurs négatifs de la signalisation TLR4, contrôlent respectivement la désactivation du macrophage alvéolaire et les capacités de production d'IFN- γ et de TNF- α des lymphocytes T au cours du sepsis polymicrobien. De fait, les souris septiques déficientes pour IRAK-M ou ST-2 apparaissent résistantes à une infection pulmonaire secondaire à *P. aeruginosa* (313, 320). **Ainsi, les modulations de la signalisation dépendante des TLRs pourraient contribuer à la régulation de l'immunodépression post-infectieuse, et à la susceptibilité aux infections secondaires.**

Afin de préciser le rôle des cellules dendritiques, des lymphocytes de type innés et de la signalisation dépendante des récepteurs TLRs dans les mécanismes qui favorisent l'apparition d'une immunodépression post-infectieuse, nous avons entrepris un programme de recherche combinant une approche translationnelle et expérimentale et comportant trois objectifs principaux:

- Etude translationnelle : évaluation cinétique des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes circulantes chez le patient septique et association avec la survenue d'infections nosocomiales. (collaboration avec le groupe d'Anne Hosmalin, équipe « Présentation de l'antigène par les cellules dendritiques », Institut Cochin).
- Etude translationnelle : évaluation de 3 sous-populations de lymphocytes T de types innés (lymphocytes $\gamma\delta$, NKT et MAIT) chez le patient septique et relation avec la survenue d'infections nosocomiales (collaboration avec le groupe d'Olivier Lantz, équipe « Immunité et cancer », Institut Curie).
- Etude expérimentale : évaluation du rôle de TLR2, TLR4 et TLR5 sur la réponse antibactérienne dans un modèle murin de pneumonie secondaire par instillation intra-trachéale de *P. aeruginosa* à distance (8 jours) d'un sepsis polymicrobien subléthal.

RESULTATS

Chapitre 1:

La persistance de la déplétion profonde des cellules dendritiques circulantes induites par le sepsis est associée à la survenue d'infections nosocomiales

Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock

D. Grimaldi, S. Louis, F. Pène, G. Sirgo, C. Rousseau, Y. E. Claessens, L. Vimeux, A. Cariou, J. P. Mira, A. Hosmalin & J. D. Chiche

Intensive Care Medicine 2011 Sep;37(9):1438-46

Plusieurs travaux expérimentaux ont impliqué les cellules dendritiques dans l'immunodépression post-infectieuse. Chez l'homme, une étude autopsique a rapporté une déplétion des CD dans la rate de patients décédés de sepsis (284). Les CD représentent une fraction minime (<1%) des leucocytes circulants ce qui complique leur analyse, mais il est maintenant possible de les quantifier grâce aux progrès de la cytométrie en flux. Ainsi, Guisset et coll. avaient rapporté en 2007 une diminution relative des CD circulantes au cours du sepsis chez l'homme, affectant à la fois les CD myéloïdes et plasmacytoïdes (286). L'amplitude de la déplétion des CD était corrélée à la gravité du patient et au pronostic. Cependant, cette étude était basée sur une mesure unique à 24 heures de l'admission en réanimation. En outre, l'impact de la déplétion des CD sur l'état immunitaire des patients ou la survenue d'éventuelles infections nosocomiales secondaires n'avait pas été étudié. L'existence d'une déplétion de CD induite par le sepsis avait par ailleurs été confirmée chez les patients brûlés septiques en comparaison avec des patients brûlés non septiques (321) et dans une autre cohorte de patient septique de réanimation (287).

L'objectif principal de notre travail était d'étudier l'impact du choc septique sur la numération des cellules dendritiques circulantes chez des patients à leur admission en réanimation au cours des 7 jours suivants. Les objectifs secondaires étaient d'étudier l'expression membranaire de la molécule d'activation HLA-DR, et de corréler la déplétion éventuelle des CD avec la survenue d'infections nosocomiales.

Nous avons inclus des patients pris en charge en réanimation pour choc septique. Nous avons décidé d'utiliser plusieurs populations contrôles : i) des témoins sains d'âge comparable pris en charge pour chirurgie ambulatoire programmée de la cataracte dans le service d'ophtalmologie de l'hôpital Cochin ii) des patients hospitalisés en réanimation présentant un choc d'origine non infectieuse et iii) des patients aux urgences de l'hôpital Cochin présentant une infection sans choc.

Pour quantifier les CD_s circulantes, nous avons utilisé une technique de cytométrie en flux basée sur un quintuple marquage membranaire pour identifier les CD_s myéloïdes et plasmacytoïdes. L'ajout au prélèvement sanguin de microbilles à une concentration prédéterminée a permis une numération des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes.

Les principaux résultats de cette étude peuvent être résumés ainsi :

- Quarante trois patients présentant un choc septique, 29 avec un choc non septique, 16 avec un sepsis non sévère et 16 témoins sains ont été inclus dans l'étude. Les patients admis en réanimation étaient comparables en terme de gravité évaluée par le score SAPS II, en terme de défaillance d'organe (score SOFA), et en terme de mortalité (tableau 1).
- La présence d'un choc septique était associée à une déplétion profonde des cellules dendritiques circulantes myéloïdes et plasmacytoïdes en comparaison avec les trois groupes contrôles. Les patients admis pour un choc non infectieux présentaient également une diminution moins marquée des cellules dendritiques circulantes par comparaison aux témoins sains (Fig. 1).
- Les cellules dendritiques des patients présentant un choc septique démontraient une diminution de l'expression membranaire d'HLA-DR, ajoutant aux modifications quantitatives, une altération qualitative (Fig. 2).
- La déplétion des CD_s et l'altération d'expression de HLA-DR persistaient à J3 et J7 du choc septique (Fig. 3). Alors que la numération des cellules dendritiques myéloïdes augmentait entre J1 et J7 chez les patients sans infection nosocomiale, elle restait effondrée chez les patients développant une infection nosocomiale au cours de leur séjour en réanimation (Fig. 4 & 5A). L'absence d'augmentation des cellules dendritiques myéloïdes circulantes chez les patients admis pour choc septique était ainsi associée à un risque accru d'infection nosocomiale (OR 22, IC 95% 2,53-191). Dans cette population,

la non-augmentation des cellules myéloïdes dendritiques avait une valeur prédictive positive d'infection nosocomiale de 80% et une valeur prédictive négative de 84,6% (Fig. 5B). Bien qu'une tendance similaire soit observée avec les cellules dendritiques plasmacytoïdes, il n'y avait pas de différence significative de numération à J7 entre les patients avec ou sans infection nosocomiale. L'expression d'HLA-DR à la surface des cellules dendritiques n'était pas non plus associée à la survenue d'infections secondaires.

Notre étude a donc mis en évidence de profondes modifications de l'homéostasie des cellules dendritiques circulantes et associé ces changements avec une augmentation du risque d'infection secondaire. Les conséquences du sepsis sévère sur les cellules dendritiques s'intègrent donc au spectre des dysfonctions immunitaires induites par les infections graves chez l'homme.

Ce travail a plusieurs limites qu'il convient de souligner :

- Nous avons observé une association entre la déplétion des cellules dendritiques et la survenue d'une infection nosocomiale mais nous n'avons pas démontré de lien de causalité. En effet, la diminution des cellules dendritiques peut constituer un facteur favorisant aussi bien qu'une conséquence de l'infection secondaire. Le délai médian de survenue des infections (9 jours) suggère que la numération à J7 des cellules dendritiques a été réalisée à un stade « pré-clinique » de l'infection.
- Malgré un nombre total de sujet étudiés important (N=104), les effectifs au sein de chaque sous-groupe et notamment celui du groupe de patients avec choc septique étaient insuffisants pour pouvoir réaliser des analyses statistiques plus poussées et notamment pour permettre l'ajustement des analyses avec de potentiels facteurs confondant.
- L'inclusion de 12 patients dans les suites d'un arrêt cardiaque extra-hospitalier dans le groupe « choc non septique » peut altérer la pertinence du contrôle constitué par les patients présentant un choc non septique. En effet, même si la nature du choc de ces

patients n'est pas liée à une infection, l'arrêt cardiaque extra-hospitalier a été clairement associée à un risque élevé d'infection bactérienne (322) et de translocation digestive d'endotoxine (323). D'ailleurs, ces patients présentaient une baisse importante de leurs cellules dendritiques circulantes à J3.

- Nous n'avons pas étudié le mécanisme de déplétion des cellules dendritiques. Dans les modèles animaux la déplétion tissulaire des cellules dendritiques est liée à un phénomène d'apoptose (278, 324) qui a également été mis en évidence dans les rates de patients décédés de sepsis (284). Parmi les autres mécanismes envisageables, les hypothèses d'une augmentation de la migration tissulaire et/ou d'une séquestration ganglionnaire sont possibles mais difficiles à vérifier dans le contexte clinique.
- L'absence d'étude fonctionnelle des cellules dendritiques comme leur capacité d'activation des lymphocytes T ou de production de cytokines limite l'interprétation de la diminution de l'expression membranaire d'HLA-DR. Cependant cette anomalie a été retrouvée par le groupe du Dr Hotchkiss dans une étude autopsique récente chez des patients décédés de sepsis. Les cellules dendritiques spléniques présentaient une diminution de l'expression d'HLA-DR et de CD86 associée à une expression plus élevée de la molécule inhibitrice PDL-1 (306).

Nos résultats soulèvent plusieurs questions non résolues :

- Quelles sont les contributions respectives de l'infection et du choc dans l'altération des cellules dendritiques constatées au cours du choc septique ? Le choc est une situation aiguë critique dont les causes sont variées et pas exclusivement infectieuses. Quelle que soit leur étiologie, les situations d'ischémie-reperfusion sont caractérisées par des réponses communes, dont la libération de molécules de danger ou DAMPs qui pourraient contribuer aux perturbations immunologiques constatées. L'inclusion de patients présentant des chocs non septiques de gravité comparable aux patients avec choc

infectieux représente un point fort de notre étude et suggère un rôle propre de la défaillance hémodynamique dans la déplétion des cellules dendritiques. De même l'inclusion d'un groupe contrôle de patients avec une infection peu sévère permet d'appréhender le rôle propre de l'infection. Ainsi, la déplétion des cellules dendritiques apparaît particulièrement prononcée lorsque l'infection s'associe à une atteinte sévère de l'organisme. Une action coordonnée de PAMPS et de DAMPs par l'intermédiaire des TLRs pourrait représenter une hypothèse physiopathologique séduisante pour expliquer une apoptose massive des cellules dendritiques en réponse au choc septique (119).

- Nous avons étudié les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes, individualisées dans le sang périphérique en fonction de leurs marqueurs phénotypiques. Ces cellules sont dotées de fonctions différentes (190). Les cellules dendritiques myéloïdes circulent dans le sang sous forme immatures et sont présentes dans tous les tissus sous la forme de cellules dendritiques résidentes matures qui sont capables d'initier la réponse immunitaire adaptative. En réponse à une infection par un pathogène, elles développent séquentiellement des fonctions de phagocytose puis de présentation de l'antigène et de production d'IL-12, aboutissant à l'activation et à la différenciation des lymphocytes T. Leur déplétion pourrait compromettre cette activation et donc le recrutement et la coordination des cellules de l'immunité au site de l'infection secondaire. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes expriment le CD123, et sont les principales cellules sécrétrices d'interférons de type I (IFN- α , - β , - ω) en réponse à une stimulation des TLRs intracellulaires. Elles répondent ainsi particulièrement aux infections virales mais aussi aux signaux de danger tel que l'ADN de cellules apoptotiques (325). Ces caractéristiques pourraient expliquer l'absence de corrélation entre leur déplétion et le risque d'infection secondaire bactérienne, il serait par contre intéressant de savoir si leur déplétion est corrélée avec le risque de réactivation virale (HSV, CMV) après un choc septique.

D. Grimaldi
S. Louis
F. Pène
G. Sirgo
C. Rousseau
Y. E. Claessens
L. Vimeux
A. Cariou
J. P. Mira
A. Hosmalin
J. D. Chiche

Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock

Received: 4 February 2011
Accepted: 27 May 2011

© Copyright jointly held by Springer and ESICM 2011

D. Grimaldi and S. Louis contributed equally to this work.

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-011-2306-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Grimaldi · F. Pène · A. Cariou · J. P. Mira · J. D. Chiche (✉)
Medical Intensive Care Unit, Hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France
e-mail: jean-daniel.chiche@cch.aphp.fr
Tel.: +33-1-58412501
Fax: +33-1-58412505

D. Grimaldi · S. Louis · F. Pène · G. Sirgo · C. Rousseau · Y. E. Claessens · L. Vimeux · A. Cariou · J. P. Mira · A. Hosmalin · J. D. Chiche
Université Paris-Descartes,
22 Rue Méchain, 75014 Paris, France

D. Grimaldi · S. Louis · F. Pène · G. Sirgo · C. Rousseau · Y. E. Claessens · L. Vimeux · J. P. Mira · A. Hosmalin · J. D. Chiche
INSERM, U1016, Institut Cochin,
22 Rue Méchain, 75014 Paris, France

D. Grimaldi · S. Louis · F. Pène · G. Sirgo · C. Rousseau · Y. E. Claessens · L. Vimeux · J. P. Mira · A. Hosmalin · J. D. Chiche
CNRS, UMR 8104, Paris, France

Y. E. Claessens
Emergency Department, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France

Abstract *Purpose:* Septic shock induces a decrease in dendritic cells (DCs) that may contribute to sepsis-induced immunosuppression. We analyzed the time course of circulating DCs in patients with septic shock and its relation to susceptibility to intensive care unit (ICU)-acquired infections. *Methods:* We enrolled adult patients with septic shock ($n = 43$), non-septic shock ($n = 29$), and with sepsis without organ dysfunction ($n = 16$). Healthy controls ($n = 16$) served as reference. Blood samples were drawn on the day of shock (day 1), then after 3 and 7 days. Myeloid (mDC) and plasmacytoid (pDC) DCs were counted by flow cytometry. Cell surface HLA-DR expression was analyzed in both DC subsets. *Results:* At day 1, median mDC and pDC counts were dramatically lower in septic shock patients as compared to healthy controls (respectively, 835 mDCs and

178 pDCs/ml vs. 19,342 mDCs and 6,169 pDCs/ml; $P < 0.0001$) but also to non-septic shock and sepsis patients ($P < 0.0001$). HLA-DR expression was decreased in both mDCs and pDCs within the septic shock group as compared to healthy controls. DC depletion was sustained for at least 7 days in septic shock patients. Among them, 10/43 developed ICU-acquired infections after a median of 9 [7.5–11] days. At day 7, mDC counts increased in patients devoid of secondary infections, whereas they remained low in those who subsequently developed ICU-acquired infections. *Conclusion:* Septic shock is associated with profound and sustained depletion of circulating DCs. The persistence of low mDC counts is associated with the development of ICU-acquired infections, suggesting that DC depletion is a functional feature of sepsis-induced immunosuppression.

Keywords Septic shock · Dendritic cells · Sepsis-induced immunosuppression · Nosocomial infection

Introduction

The immune response to microbial infection relies on both innate and adaptive components in a sequential and coordinated manner [1]. Dendritic cells (DCs) constitute a pivotal link between those two arms of the host response and play an important role in the integration of the inflammatory response. As “professional” antigen-presenting cells, they initiate and polarize the adaptive immune response in activating T cells. Cytokines released by DCs orient the phenotype of T cells and drive them into different T-helper (Th) patterns [2]. Whereas the initial pro-inflammatory response is characterized by a Th-1 pattern, a second phase often follows septic shock (SS) and damage of host tissue [3] and leads to a post-infective immunosuppressive state, which is characterized by a shift to a predominantly Th-2 response with decreased production of pro-inflammatory cytokines [4] and apoptosis of B- and T-lymphocytes [5]. Selective depletion of DCs in secondary lymphoid organs reported in murine models of sepsis [6, 7] and in patients who died from sepsis [8], points to an important role of DCs in the pathophysiology of sepsis-induced immune dysfunction.

Circulating DC subsets represent only a small subset of DCs compared to tissular DCs. Circulating DCs correspond mostly to DC precursors and to a few mature DCs re-circulating from lymph nodes. Conversely to interstitial DCs, which migrate in lymph nodes upon inflammation stimuli, little is known about the migrating capacity of circulating DCs. Indeed, they may interact with white blood cells before any migration step and could be directly recruited to the lymph nodes of injured tissues [9]. The DCs can be separated into myeloid (mDCs) and plasmacytoid (pDCs) according to the expression of the membrane markers CD11c and CD123 [10]. Antigen presentation is the primary function of mDCs, the “classical” DCs. pDCs express lower levels of type II HLA and release large amounts of type I interferons [11]. As circulating DCs cannot be counted by an automated hemocytometer, they have not been extensively studied during SS. Recently, an early decrease in circulating DCs has been reported during human SS [12]. Whether shock or infection by itself is associated with decreased circulating DCs is unclear. Finally, the influence of circulating DC counts on the risk of secondary infections in patients with SS is unknown. To address these questions, we used a flow cytometry-based assay to quantify circulating DCs and their HLA-DR surface expression at the time of diagnosis and during the first week of evolution in patients with SS using patients with sepsis or non-septic shock (NSS), and healthy people as controls.

Patients and methods

Patients

All consecutive patients with septic or NSS admitted to our tertiary ICU between August 2007 and May 2008 were eligible. Patients with sepsis were identified in the emergency department. Sepsis (S) was defined as the presence of two criteria for systemic inflammatory response syndrome (SIRS) without organ failure and SS as sepsis with the need for vasopressor despite fluid expansion [13, 14]. For patients with NSS, cardiogenic shock was defined by the presence of myocardial dysfunction (left ventricular ejection fraction less than 30% assessed by echocardiography) and the need for inotropic support by dobutamine (more than 5 µg/kg/min) or epinephrine at any dose in the absence of patent infection [15]. Hemorrhagic shock was defined as hypotension with acute hemorrhage requiring transfusion of at least four packs of red blood cells in 24 h. Exclusion criteria were age less than 18 years, pregnancy, do-not-resuscitate orders on admission, hematologic malignancy, immunodeficiency defined as HIV infection, presence of bone marrow or solid organ transplantation, daily corticosteroid therapy greater than 0.5 mg/kg prednisone equivalent, chemotherapy or any other immunosuppressive treatments. As DC counts vary with age, we enrolled healthy volunteers and elderly patients scheduled for elective cataract surgery to build a cohort of 16 age- and sex-matched healthy controls. Subjects were excluded from the control cohort if they had any inflammatory disease, received oral corticotherapy, or if they presented infectious symptoms the previous month. Our institution's ethics committee approved the study. As it was purely observational and did not require any additional blood sampling as compared to routine care, consent was waived for ICU patients. Written informed consent was obtained for controls.

Data collection

We recorded demographic data, SAPS II and SOFA score on admission, and collected daily SOFA scores, duration of hemodynamic support, and ICU survival. All physiological variables obtained during routine patient monitoring were recorded using the Centricity Clinisoft® software (GE Healthcare). Patients were screened daily for the presence of ICU-acquired infection, using usual criteria for catheter-related, spontaneous bacteremia, and ventilator-associated pneumonia [16, 17]. Physicians in charge of the patients were blinded to the results of DC counts.

DCs analysis

Two-hundred microliters of blood sample was drawn for DC analysis. In ICU patients, the first sample was obtained on the morning following admission (day 1) and analysis was repeated at days 3 and 7. Quantification of DCs was performed with the Trucount[®] assay (BD Biosciences) as described elsewhere [18, 19]. Briefly, 100 μ l of whole blood was incubated with a fixed number of beads and with a mixture of fluorescent antibodies (anti-CD45-APC-Cy7, anti-lineage-FITC, anti-HLA-DR-PerCP, anti-CD11c-PE, and anti-CD123-APC) or with corresponding isotypic controls. Cell analysis was performed on a FACSCanto cytometer (BD Biosciences) and at least 10^5 CD45⁺ cells were acquired. Human pDCs and mDCs were defined respectively, as CD123⁺HLA-DR⁺Lin⁻ and CD11c⁺HLA-DR⁺Lin⁻ cells. DC counts (cells per milliliter) were determined as: (cell number in gate “pDC” (or “mDC”)/bead number in the gate “beads”) \times (bead number in Trucount tube/blood volume). Mean fluorescence index (MFI) for HLA-DR was analyzed on DCs subsets. Dot plots typical for a healthy control or patient with SS are shown in Fig. S1 in the supplementary material.

Statistical analysis

Categorical data are presented as number (%) and compared by using the chi square or Fisher's exact tests as appropriate. Given the non-normal distribution of continuous variables (age, DC, leukocytes and lymphocytes

counts, MFI), they are presented as median (interquartile range—IQR) and compared using the Mann–Whitney test. Comparisons of DC counts between the four patients' groups were done using a Kruskal–Wallis test. Comparisons of paired variables between days 1, 3, and 7 were analyzed using a Friedman test. Results are shown as box plots with outliers shown as circles. The ratio day 7 DC count/day 1 DC count was categorized as greater or less than 1. Simple logistic regression was used to calculate the odds ratio of a value lower than 1 (i.e., decrease of DCs count) to predict ICU-acquired infections. To evaluate the value of mDC and pDC counts to predict the advent of ICU-acquired infections, receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed. All analyses were done with SPSS 12.0 software.

Results

Population characteristics

Between August 2007 and May 2008, 88 patients were enrolled in the study. Patients' characteristics are shown in Table 1. Patients with septic and NSS were comparable in terms of age, sex ratio, SAPS II, and SOFA score on admission. As expected, patients with sepsis had lower SAPS II and SOFA scores. ICU survival was similar between SS and NSS patients (62.7 and 62.1%, respectively). Septic shock patients had a lower lymphocyte count and a significantly longer ICU length of stay. Nine of these patients were bacteremic and microbiological documentation could not be obtained in five other patients

Table 1 Population characteristics

	Septic shock	Non-septic shock	Sepsis	<i>P</i>
Number of patients	43	29	16	
Female (%)	17 (39.5)	12 (41.4)	5 (31.25)	NS
Age (years)	67 (56.5–79)	68 (54–79)	67.5 (41–85)	NS
APACHE II	32 (27–35)	33 (28–41)	8 (4.75–10)	<0.0001
SAPS II	71 (61.5–83)	76 (60–87)	22.5 (13–27)	<0.0001
SOFA admission	10 (6.5–14)	10 (8–13)	0.5 (0–1)	<0.0001
Primary injury	Pneumonia 25 (58)	Cardiogenic shock 12 (41)	Pneumonia 8 (50)	NA
	Abdominal sepsis 7 (16)	Cardiac arrest 12 (41)	Urinary 4 (25)	
	Other 11 (26)	Hemorrhage 5 (17)	Other 4 (25)	
Leukocytes (G/L)	10.2 (7.2–20.5)	13.2 (8.6–17.6)	9.15 (5.4–11.8)	0.11
Lymphocytes (G/L)	0.42 (0.27–0.85)	1.01 (0.63–1.68)	1.27 (0.84–1.56)	0.0004
Length of ICU stay	9 (5–13)	4 (3–9)	NA	0.01*
Shock duration	3 (2–5)	3 (2–4)	NA	NS*
Death in ICU	16 (37.3)	11 (37.9)	NA	NS*
D1 SOFA	12 (9–14.5)	11 (8.5–14)	NA	NS*
D3 SOFA	8 (4–11)	8.5 (8–11)	NA	NS*
D7 SOFA	8 (4–11)	6 (4.5–8.5)	NA	NS*
Number of patients at D3	40 (93%)	17 (58.6%)	NA	
Number of patients at D7	23 (53.5%)	8 (27.6%)	NA	

Categorical variables are expressed as number and percentage and compared using Fisher test. Continuous variable are expressed as median (interquartile) and compared by Kruskal–Wallis test or

Mann–Whitney test (*) when only septic shock and non-septic shock groups are analyzable

NA not available, NS not significant, D day

Table 2 Comparison between septic shock patients with and without ICU-acquired infection

	ICU-acquired infections	No infections	<i>P</i>
Number of patients at day 1	10	33	
Age (years)	62.5 (54.5–69)	70 (58–79)	NS
Female (%)	2 (20)	18 (55)	0.15
APACHE II	33 (28–35.5)	32 (27–39)	NS
SAPS II	70 (66–80.5)	74 (59–83)	NS
SOFA admission	13 (10–14)	9 (6–13)	NS
Death in ICU	4 (40)	12 (36.4)	NS
D1 lymphocytes G/L	0.62 (0.34–1.07)	0.40 (0.27–0.82)	NS
D7 lymphocytes G/L	1.29 (0.66–2.62)	1.08 (0.83–1.43) ^a	NS

Categorical variables are expressed as number and percentage and compared using Fisher test. Continuous variable are expressed as median (interquartile) and compared by Mann–Whitney test

^a The number of patients without infection at day 7 is 13

(11.6%). None of the patients with sepsis had bacteremia and none developed SS.

Circulating DC counts are dramatically decreased during septic shock

As shown in Fig. 1, mDC and pDC counts significantly differed between groups ($P < 0.001$ for both mDCs and pDCs). Patients with SS had lower mDC and pDC counts than healthy controls ($P < 0.0001$), NSS patients ($P < 0.0001$), and patients with sepsis ($P < 0.0001$). Note that patients with NSS also had lower circulating DC counts than healthy controls ($P = 0.009$ and $P < 0.0001$, respectively), whereas sepsis patients had lower circulating pDC counts ($P = 0.02$) but comparable mDC counts compared with healthy controls. Cell surface expression of HLA-DR was significantly lower on circulating mDCs and pDCs in SS patients, as compared to healthy controls ($P = 0.005$, and $P = 0.037$, respectively) (Fig. 2). Cell surface expression of HLA-DR on mDCs was significantly lower in NSS and sepsis patients than in healthy controls ($P = 0.015$ and $P = 0.026$, respectively), whereas no difference was observed on pDCs. Cell surface expression

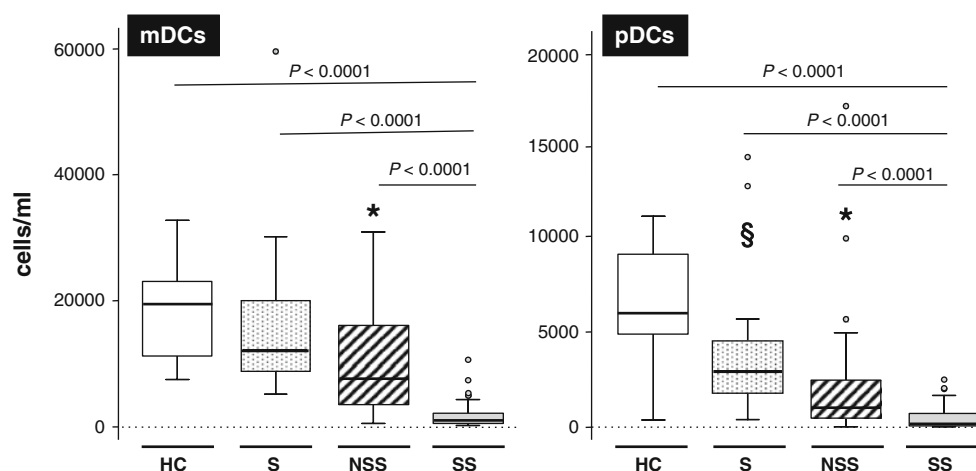
of HLA-DR on mDCs and pDCs was not different between SS, NSS, and sepsis patients. For all patients groups, we found no correlation between circulating DC counts and SAPS II, admission SOFA scores, or mortality rates (data not shown).

Counts of circulating DC were measured at days 3 and 7 for patients with SS and NSS (Fig. 3). In patients with SS, mDC and pDC counts remained significantly lower than in NSS patients at day 3 ($P = 0.013$ and 0.025 , respectively). A similar trend was observed at day 7. Expression of HLA-DR decreased significantly between day 1 and day 7 in both groups of patients (Fig. S2, supplementary material).

Persisting low mDC counts at day 7 is associated with ICU-acquired infections in SS patients

Among the 43 patients with SS, 10 presented 20 episodes of ICU-acquired infections (13 ventilator-associated pneumonia, 4 catheter-related infections, 2 peritonitis, and 1 mediastinitis) detailed in Table S1 in the online supplementary material. Table 2 summarizes the characteristics of those patients. The first episode occurred 9 [7.5–11]

Fig. 1 Comparison of circulating mDC and pDC counts in patients with septic shock (SS, grey boxes, $N = 43$), non-septic shock (NSS, dashed boxes, $N = 29$), sepsis (S, dotted boxes, $N = 16$), and healthy control (HC, white boxes, $N = 16$) at day 1. *mDC and pDC counts of NSS patients were lower than HC ($P = 0.009$ and $P < 0.0001$, respectively). §pDC count of S patients was lower than HC ($P = 0.02$). Comparisons between each group of patients are done using Mann–Whitney test



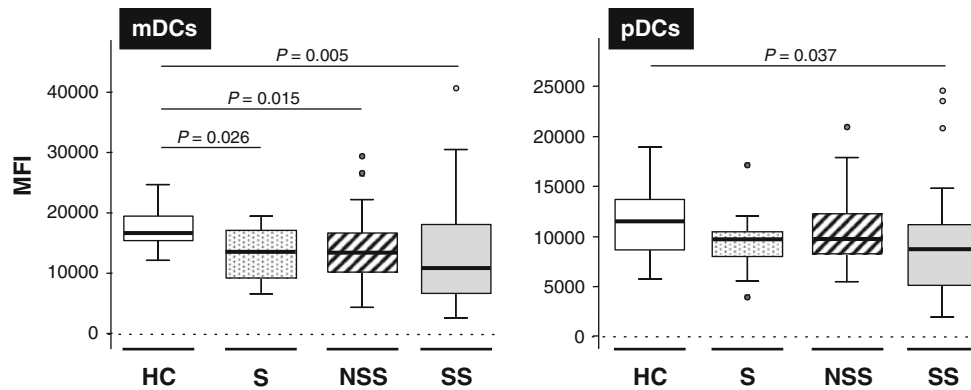
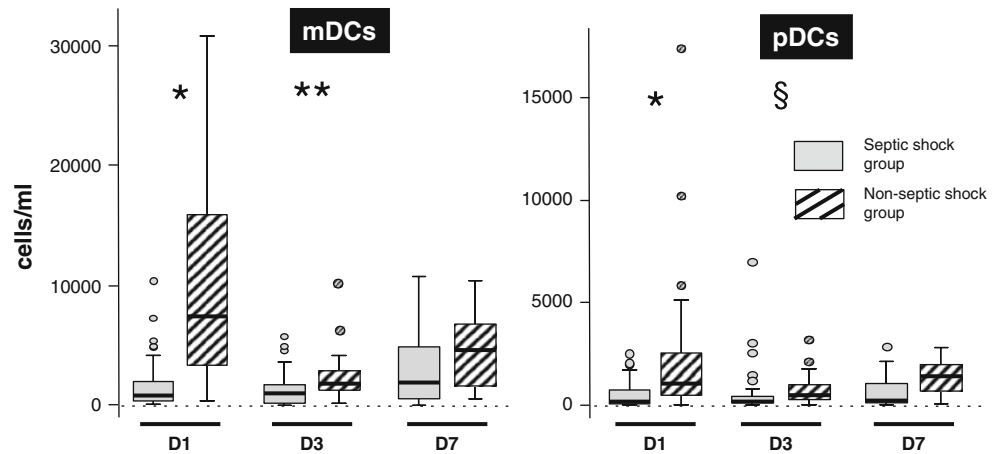


Fig. 2 Comparison of HLA-DR expression on mDCs and pDCs in patients with septic shock (SS, grey boxes, $N = 43$), non-septic shock (NSS, dashed boxes, $N = 29$), sepsis (S, dotted boxes, $N = 16$), and healthy control (HC, white boxes, $N = 16$) at day 1; 8

and 3 patients of the SS and NSS groups have a pDC count less than 50/ml, so that MFI of HLA-DR could not be analyzed. Comparisons between each group of patients are done using Mann-Whitney test

Fig. 3 Evolution at days 1, 3, and 7 (D1, D3, D7) of circulating mDC and pDC counts in patients with septic shock (grey boxes, $N = 40$ at day 3 and 23 at day 7) or non-septic shock (dashed boxes, $N = 17$ at day 3 and 8 at day 7). Comparisons are done using Mann-Whitney test between SS and NSS patients day by day. $*P < 0.0001$, $**P = 0.013$, $§P = 0.025$



days following ICU admission. Figure 4 shows the time course of mDCs and pDCs in patients with or without ICU-acquired infection. Whereas mDC counts increased in patients without ICU-acquired infection ($P = 0.023$), mDCs remained low in those who developed at least one episode of infection. At day 7, mDC counts were significantly lower in patients who developed ICU-acquired infection (786/ml [101–2,345] vs. 2,878/ml [1,620–8,383] in patients without ICU-acquired infection $P = 0.036$). As shown in Fig. 5a, the variation in circulating mDC counts between days 1 and 7 (DC count day 7/DC count day 1) was lower in patients who developed ICU-acquired infections (0.44 [0.22–0.54] vs. 4.31 [1.53–7.54], $P = 0.036$). Thus, a decrease in mDC count between day 1 and day 7 was associated with an increased risk of subsequent infection (OR 22 [2.53–191], $P = 0.005$) with a predictive positive value of 80% and a negative predictive value of 84.6%. As shown in Fig. 5b, the day7/day1 ratio of mDCs has an area under the ROC curve (AUC) of 0.762 (CI 0.544–0.979) to predict the advent of an ICU-acquired infection. Despite a similar trend, circulating pDC counts

did not significantly differ between patients with or without ICU-acquired infection (Fig 5a, b). Neither mDC HLA-DR expression at days 1, 3, or 7 nor its relative change were associated with ICU-acquired infection (data not shown). Changes in DCs count and HLA-DR expression for individual SS patients with or without ICU-acquired infections are shown in the online supplementary material (Figs. S4 and S5, respectively). In the NSS group, 4 patients developed ICU-acquired infections. The evolution of their DC counts is shown in Fig. S3 in the online supplementary material.

Discussion

Our study shows that, as compared to moderately severe infections and other types of shock, SS is associated with a profound decrease in circulating mDCs and pDCs. Moreover, a persistent decrease in mDCs is associated with the advent of ICU-acquired infection, suggesting

Fig. 4 Evolution of mDCs and pDCs in septic shock patients with (grey boxes, $N = 10$) or without (white boxes, $N = 33$ at day 1, 30 at day 3, and 13 at day 7) ICU-acquired infection (IAI) at days 1, 3, and 7 (D1, D3 D7). *Comparison of repeated mDC counts in patients without ICU-acquired infection using Friedman test, $P = 0.023$. §Comparison of day 7 mDCs count between patients with and without ICU-acquired infection using Mann-Whitney test, $P = 0.036$

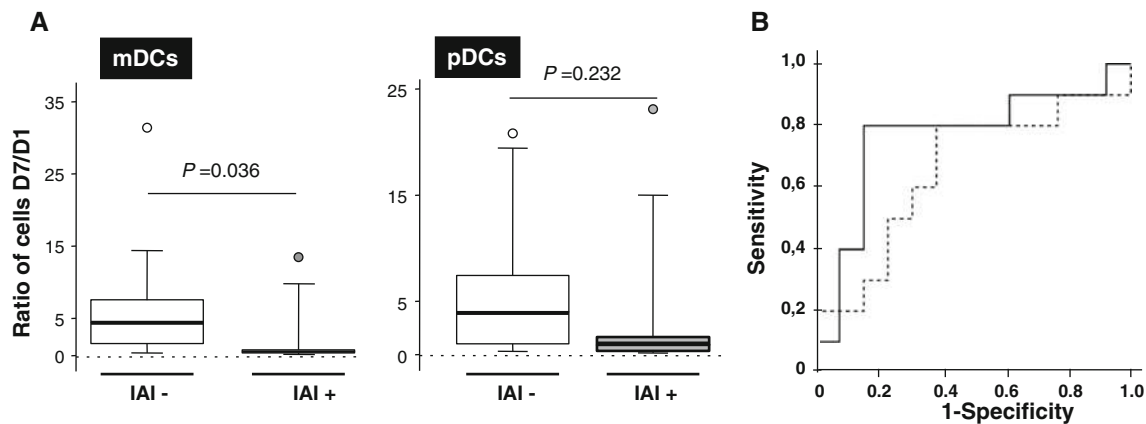
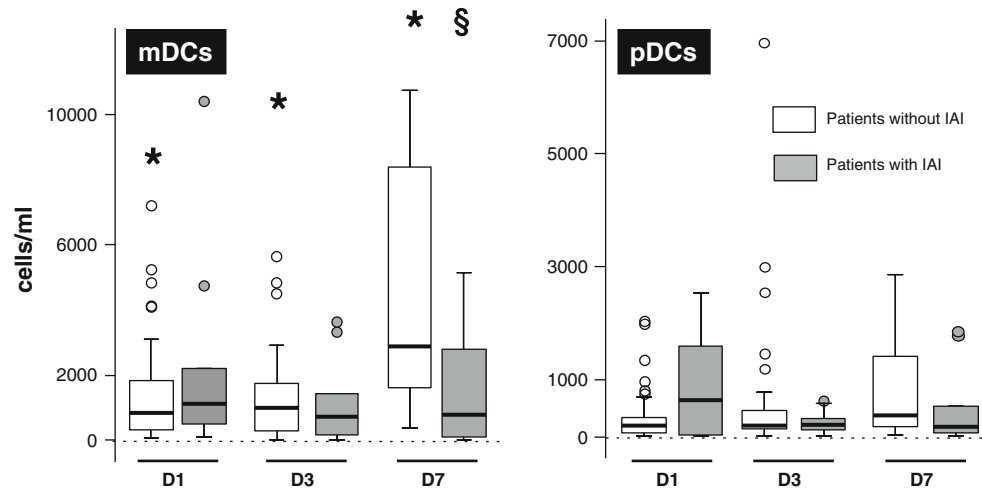


Fig. 5 **a** Comparison of variation (i.e., ratio of day 7 and day 1 cell count) of mDCs and pDCs in patients with (grey boxes, $N = 10$) or without (white boxes, $N = 13$) ICU-acquired infection by Mann-

Whitney test. **b** ROC curve of mDCs (black line) and pDCs (dashed line) ratio to assess ICU-acquired infection (IAI)

the important role of these cells in post-infective immunodysfunction.

Very few studies investigated changes in circulating DCs in patients with SS [12, 20]. Guisset et al. [12] reported a decrease in initial DC counts that correlated with severity scores and survival. Interestingly, mortality rate reported in this study was higher (52.4%) than in our cohort despite lower SAPS II scores, indicating that factors not captured by the SAPS II score might have contributed to outcome. A case-mix of more severe SS patients with lower DC counts in our cohort might explain the absence of relationship between survival and DC counts. Poehlmann et al. [20] investigated changes in monocytes and DC counts on admission and 28 days after the onset of severe sepsis or SS. They also report a significant decrease in DC counts as compared to healthy controls, as well as decreased HLA-DR expression consistent with our results. A direct downregulation of HLA-DR expression at the surface of DCs or the differentiation

of monocytes with sepsis-induced loss of HLA-DR expression [15, 21] into a subpopulation of circulating DCs with altered maturation could explain this finding. A decrease of membrane HLA-DR expression on DCs may also indicate DC apoptosis [22]. Finally, in the small cohort reported by Poehlmann et al. [20], DC counts failed to return to normal values in the 12 patients that were still alive at day 28, but the data provided do not permit any conclusion to be drawn regarding the link with ICU-acquired infection or patient outcome.

To our knowledge, our study is the first to demonstrate that circulating DCs are selectively depleted in SS as compared to shock from other etiologies and moderately severe infection. Our results indicate that the effects of infection and shock on DC counts were synergistic, as mDCs from patients with SS were decreased more than 20 times in comparison with healthy controls, whereas this factor was only about three for mDCs from patients with NSS. The mechanisms that may lead to a more profound

depletion of DCs in the combined presence of infection and shock are unknown. One can speculate that activation of the inflammatory response through detection of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and release of danger-associated molecular patterns [23] lead synergistically to profound DC depletion, whereas signals induced by recognition of PAMPs only have a modest effect on DC counts. Consistent with this hypothesis, a decrease in circulating DCs has been reported in infected burn patients, a clinical context in which infection and tissue damage coexist [24]. Alternatively, the loss of compartmentalization of the infection and the presence of overwhelming inflammation in the SS setting may contribute to activate molecular mechanisms that lead to the depletion of circulating DCs [25].

In our study, persistent depletion of mDCs is associated with the advent of ICU-acquired infection, highlighting the role of DCs in sepsis-induced immunosuppression. We have studied two subsets of circulating DCs and found only depletion of mDCs to be associated with secondary infection. As precursors of interstitial DCs, mDCs are the professional antigen-presenting cells and they contribute to initiate the adaptive immune response [26]. Together with monocytes and granulocytes they also secrete IL-12 as well as IL-10 [27]. The specific role of mDCs in antigen presentation as compared with pDCs suggests that the susceptibility to secondary infection involves an impairment of adaptive immunity. Several experimental studies suggest that quantitative and functional abnormalities of DCs increase susceptibility to secondary infection [28–30]. Indeed, polymicrobial sepsis induces persistent functional abnormalities of DCs characterized by impaired maturation, defective activation in response to Toll-like receptors agonists, imbalance between the production of IL-12 and IL-10 thereby skewing the immune response toward a Th-2 pattern, and a defective priming of T cell lymphocytes [30, 31]. Such functional abnormalities have been linked to increased susceptibility to secondary *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia or invasive aspergillosis [28–30]. In humans, few data establish a link between sepsis-induced immunodysfunction and increased susceptibility to nosocomial sepsis. Besides quantitative disorders, circulating DCs from septic patients exhibit functional defects through a marked and prolonged impairment in pro-inflammatory cytokines production [20]. Most importantly, reduced monocyte HLA-DR expression, another feature of sepsis-induced immunodysfunction associated with impaired antigen presentation, has been associated with increased mortality [15, 21], and very recently to increased susceptibility to ICU-acquired infection [32]. Consistent with the data from Landelle et al. [32], our study suggests that sepsis-induced immune dysfunction might facilitate the development of nosocomial infections in humans.

Beside its monocentric design, our study has several limits. First, we did not precisely address the mechanism that leads to depletion of circulating DCs. We can reasonably hypothesize that apoptosis accounts for DCs depletion as previously demonstrated for depletion of spleen DCs in humans [8] and in murine models [6, 7, 33]. However, other mechanisms such as bone marrow insufficiency [34] or increased migration in peripheral tissues cannot be ruled out. Little is known regarding migration of circulating DCs in sepsis. Potential destinations of blood-borne DCs include the skin, lymph nodes, thymus, and spleen [9]. Although migration of circulating DCs to the spleen and lymph nodes might happen during SS, several studies have documented apoptosis-related depletion of DCs in these secondary lymphoid tissues in animal models of sepsis [6, 7, 33] suggesting that apoptosis is one of the primary mechanisms leading to immune cells depletion. Second, despite the relatively large number of patients enrolled, the number of episodes was too low to perform a reliable multivariate analysis of factors associated with the risk of ICU-acquired infections. Finally, our data do not allow one to formally state whether DC depletion was a cause or a consequence of secondary infections. However, the fact that 80% of secondary infections developed after day 7 suggests that low mDC counts preceded the development of secondary infections. Greater availability of flow cytometry-based assays to get better insights into the immune status of patients during the clinical course of SS should allow one to confirm these findings in a larger cohort.

In summary, our data show that SS is specifically associated with a profound depletion of circulating DCs, associated with a downregulation of HLA-DR membrane expression. Persistent depletion of mDCs at day 7 is associated with the advent of ICU-acquired infection. Immuno-monitoring using flow cytometry-based assays may allow one to detect a subgroup of patients at high risk of secondary infections that might benefit from strategies designed to improve survival and restore the function of DCs.

Acknowledgments This work was supported by grants from the European Society of Intensive Care Medicine and the Société de Réanimation de Langue Française. We thank Prof. A. Brezin from the Department of Ophthalmology of Cochin Hospital for the opportunity given to us to enroll the control patients. We are grateful to Dr. C. Elie for her insightful appraisal of the statistical methods used in this study.

Conflict of interest None of the authors have any financial interests with commercial organizations whose products are related to the subject matter of this manuscript (no existing conflicts of interest).

References

- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA (2008) Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8:776–787
- Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151–161
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78
- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW (1995) Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 85:1341–1347
- Hotchkiss RS, Nicholson DW (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 6:813–822
- Efron PA, Martins A, Minnich D, Tinsley K, Ungaro R, Bahjat FR, Hotchkiss R, Clare-Salzler M, Moldawer LL (2004) Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J Immunol* 173:3035–3043
- Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, Drewry AM, Chang KC, Karl IE, Hotchkiss RS (2003) Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol* 171:909–914
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE (2002) Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 168:2493–2500
- Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH (2008) Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29:325–342
- Grabbe S, Kampgen E, Schuler G (2000) Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol Today* 21:431–433
- Gilliet M, Cao W, Liu YJ (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8:594–606
- Guisset O, Dilhuydy MS, Thiebaut R, Lefevre J, Camou F, Sarrat A, Gabinski C, Moreau JF, Blanco P (2007) Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med* 33:148–152
- Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 20:724–726
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G, SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 31:1250–1256
- Caille V, Chiche JD, Nciri N, Berton C, Gibot S, Boval B, Payen D, Mira JP, Mebazaa A (2004) Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock* 22:521–526
- Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE (2001) Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* 32:1249–1272
- American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America (2005) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171:388–416
- Vuckovic S, Gardiner D, Field K, Chapman GV, Khalil D, Gill D, Marlton P, Taylor K, Wright S, Pinzon-Charry A, Pyke CM, Rodwell R, Hockey RL, Gleeson M, Tepes S, True D, Cotterill A, Hart DN (2004) Monitoring dendritic cells in clinical practice using a new whole blood single-platform TruCOUNT assay. *J Immunol Methods* 284:73–87
- Hosmalin A, Lichtner M, Louis S (2008) Clinical analysis of dendritic cell subsets: the dendritogram. *Methods Mol Biol* 415:273–290
- Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C (2009) Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* 13:R119
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debarb AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P (2006) Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 32:1175–1183
- Castera L, Hatzfeld-Charbonnier AS, Ballot C, Charbonnel F, Dhuiege E, Velu T, Formstecher P, Mortier L, Marchetti P (2009) Apoptosis-related mitochondrial dysfunction defines human monocyte-derived dendritic cells with impaired immunostimulatory capacities. *J Cell Mol Med* 13:1321–1335
- Pugin J (2008) Dear SIRS, the concept of “alarmins” makes a lot of sense! *Intensive Care Med* 34:218–221
- D'Arpa N, Accardo-Palumbo A, Amato G, D'Amelio L, Pileri D, Cataldo V, Mogavero R, Lombardo C, Napoli B, Conte F (2009) Circulating dendritic cells following burn. *Burns* 35:513–518
- Cavaillon JM, Annane D (2006) Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 12:151–170
- Rossi M, Young JW (2005) Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 175:1373–1381
- Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, Carra G, Gerosa F (2008) Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol Rev* 226:112–131
- Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL (2005) Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* 105:3588–3595
- Pastille E, Didovic S, Brauckmann D, Rani M, Agrawal H, Schade FU, Zhang Y, Flohe SB (2011) Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J Immunol* 186:977–986
- Pene F, Zuber B, Courtine E, Rousseau C, Ouaz F, Toubiana J, Tazi A, Mira JP, Chiche JD (2008) Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol* 181:8513–8520
- Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL (2003) Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol* 163:2605–2617

-
32. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, Vanhems P, Monneret G (2010) Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 36:1859–1866
33. Pene F, Courtine E, Ouaz F, Zuber B, Sauneuf B, Sirgo G, Rousseau C, Toubiana J, Balloy V, Chignard M, Mira JP, Chiche JD (2009) Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect Immun* 77:5651–5658
34. Claessens YE, Fontenay M, Pene F, Chiche JD, Guesnu M, Hababou C, Casadevall N, Dhainaut JF, Mira JP, Cariou A (2006) Erythropoiesis abnormalities contribute to early onset anemia in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 174:51–57

Online supplementary material. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock.

Intensive care medicine

Grimaldi D ^{1,2,3,4,*}, Louis S ^{2,3,4,*}, Pène F ^{1,2,3,4}, Sirgo G ^{2,3,4}, Rousseau C ^{2,3,4}, Claessens YE ^{2,3,4,5}, Vimeux L ^{2,3,4}
Cariou A ^{1,2}, Mira JP ^{1,2,3,4}, Hosmalin A ^{2,3,4}, Chiche JD ^{1,2,3,4} §

1 Medical Intensive Care Unit, Hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint Jacques 75014 Paris, France.

2 Université Paris-Descartes, 22 Rue Méchain 75014 Paris, France.

3 Institut Cochin, INSERM U1016, 22 Rue Méchain 75014 Paris, France.

4 CNRS UMR 8104, 22 Rue Méchain 75014 Paris, France.

5 Emergency department, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France

§ corresponding author:

jean-daniel.chiche@cch.aphp.fr,

tel: 33 1 58 41 25 01,

fax: 33 1 58 41 25 05,

Table S1: Characteristics of the episodes of ICU-acquired infections

	Different site *	Different pathogen *	Resolution of primary infection	Time between first ICU-acquired and primary infection (days)	Type of secondary infections	Germ of secondary infection	mDC count day 1 cells/mL	mDC count day 7 cells/mL	pDC count day 1 cells/mL	pDC count day 7 cells/mL
Patient 1	No	Yes	Yes	• 9 • 12	• VAP • Catheter-related	• <i>E. cloacae</i> • CNS	743	4584	1194	1884
Patient 2	No	Yes	Yes	• 15	• VAP	• <i>P. aeruginosa</i>	10427	5149	2531	1808
Patient 3	No	Yes	Yes	• 5 • 34 • 44 • 51	• VAP • VAP • Peritonitis • Peritonitis	• <i>E. cloacae</i> • <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> • Polymicrobial • Polymicrobial	2058	817	1731	524
Patient 4	Yes	Yes	Yes	• 11	• Catheter-related	• <i>E. coli</i>	4807	1038	98	161
Patient 5	No	Yes	Yes	• 7 • 19	• VAP • VAP	• <i>E. cloacae</i> • <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	89	49	15	16
Patient 6	No	Yes	Yes	• 9 • 27	• VAP • VAP & catheter	• <i>P. aeruginosa</i> • <i>P. aeruginosa</i> & <i>Staph aureus</i>	511	125	26	181
Patient 7	No	Yes	Yes	• 9 • 15	• VAP • VAP	• <i>P. aeruginosa</i> • <i>P. aeruginosa</i> + <i>E. faecalis</i>	210	2780	14	322
Patient 8	Yes	No	Yes	• 30	• Mediastinitis	• <i>P. aeruginosa</i>	2199	0	1234	0
Patient 9	No	Yes	Yes	• 11 • 24 • 42	• VAP • VAP • VAP	• <i>P. aeruginosa</i> • <i>P. aeruginosa</i> + <i>E. coli</i> • <i>P. aeruginosa</i>	667	93	72	62
Patient 10	Yes	Yes	Yes	• 7	• Catheter-related	• <i>E. faecium</i> + <i>M. morganii</i>	1483	755	1592	82

* Comparison between primary infection and first episode of ICU-acquired infections. VAP : ventilatory associated pneumonia. CNS : coagulase negative staphylococcus

Supplemental figures captions

Fig. S1: Dot plot of gating strategy. mDCs are CD45⁺, lineage⁻, HLA-DR & CD11c double positive cells, pDCs are CD45⁺, lineage⁻, HLA-DR & CD123 double positive. Corresponding isotype control for CD11c and CD123 (IgG1-APC and IgG1-PE respectively) were used. Typical example of healthy control (HC, upper panel) and patients with septic shock (SS, lower panel) are shown. Expression of HLA-DR is shown as fluorescence-activated cell sorter analysis and the corresponding MFI is indicated on the graph.

Fig. S2: Evolution at day 1, 3 and 7 (D1, D3 D7) of HLA-DR MFI on circulating mDCs and pDCs in patients with septic shock (grey boxes) or non-septic shock (dashed boxes). Patients with less than 50 DCs/mL could not be analysed for HLA-DR expression. HLA-DR MFI decreased significantly in both groups and both DCs types ($P=0.007$ & $P=0.0035$ for mDCs and pDCs of septic shock group, $P=0.02$ & $P=0.01$).

Fig. S3: Evolution of day 1, 3 and 7 (D1, D3 D7) mDCs and pDCs counts in patients from the non-septic shock group with (dashed boxes), or without (dotted boxes) ICU-acquired infection.

Fig. S4: Evolution of individual mDC (upper panels) and pDC (lower panels) counts in patients with septic shock, which have developed (left panels) or not (right panels) ICU-acquired infections (IAI).

Fig. S5: Evolution of individual HLA-DR expression on mDCs (upper panels) and pDCs (lower panels) in patients with septic shock, which have developed (left panels) or not (right panels) ICU-acquired infections (IAI).

Fig. S1

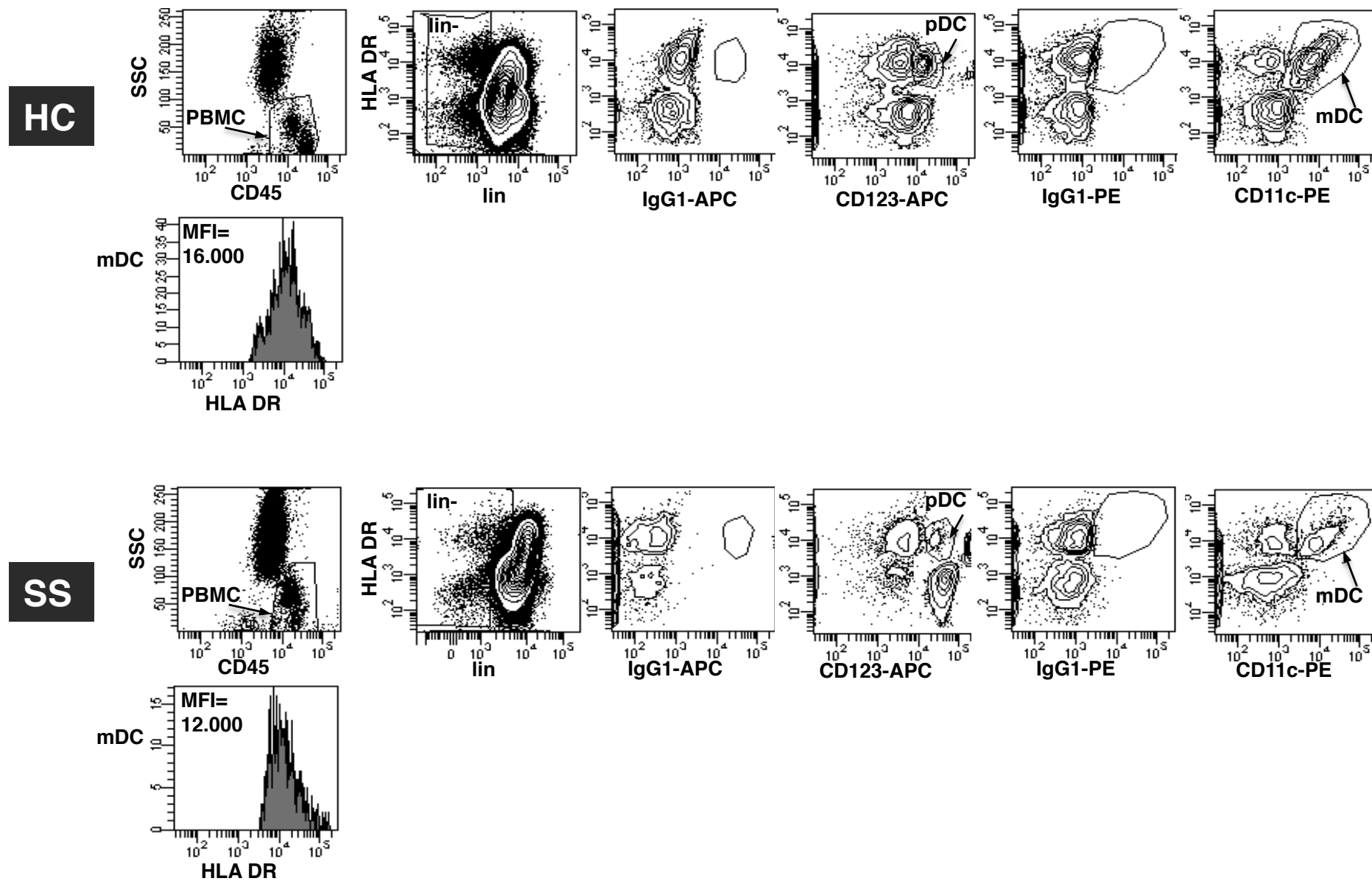


Fig. S2

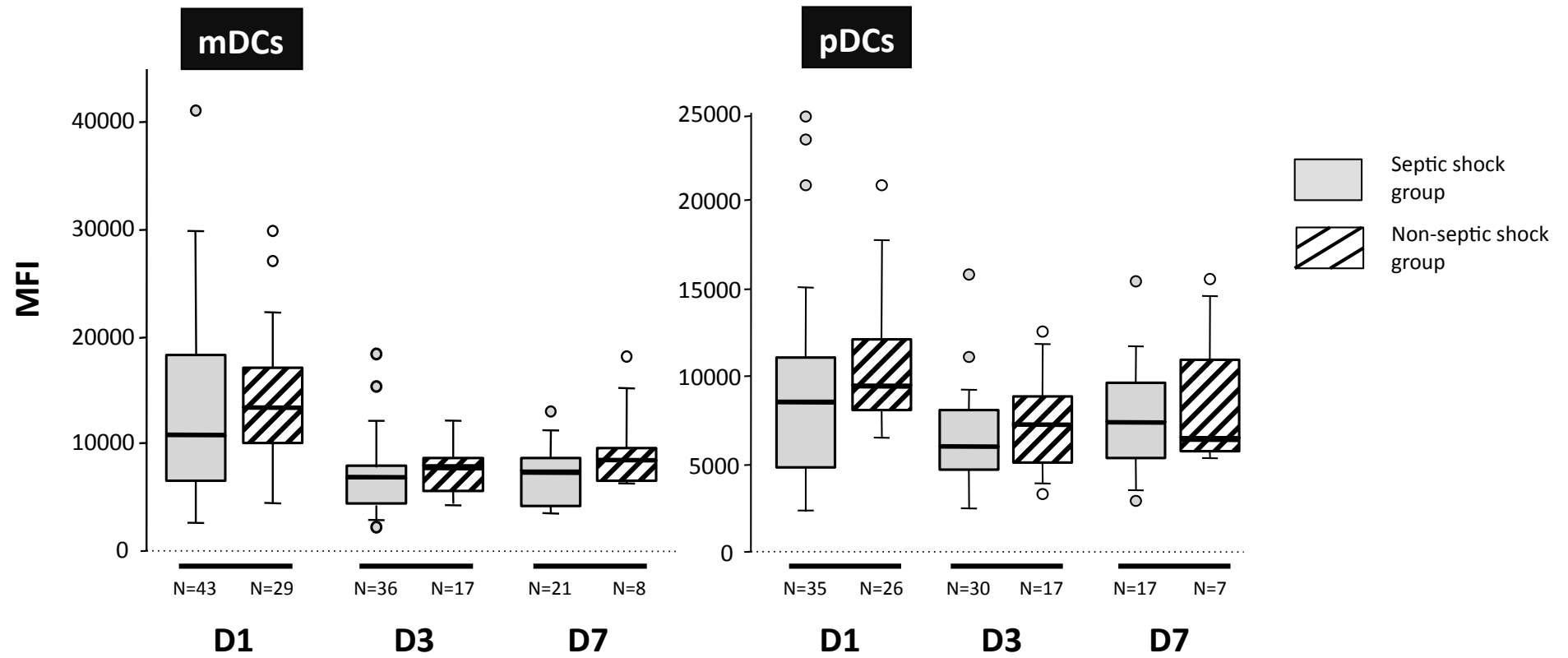


Fig. S3

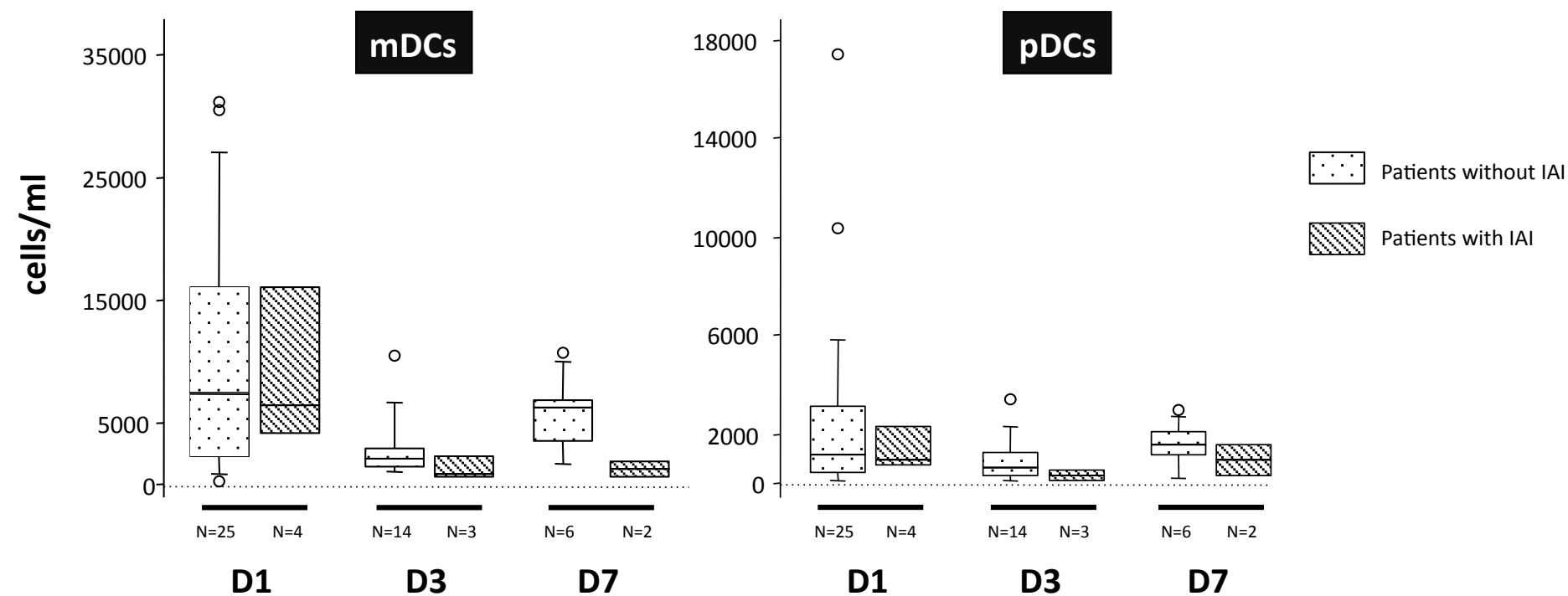


Fig. S4

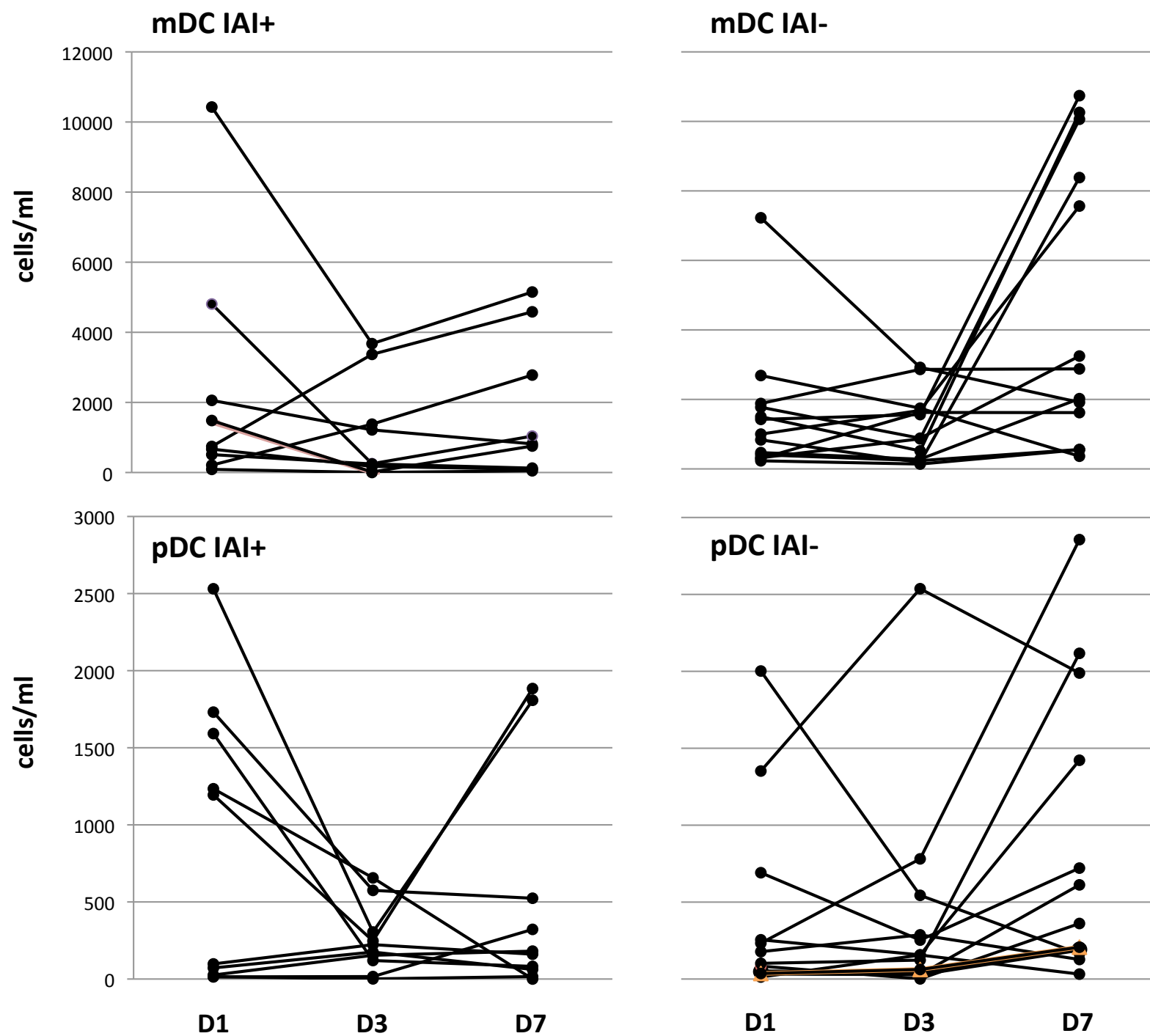
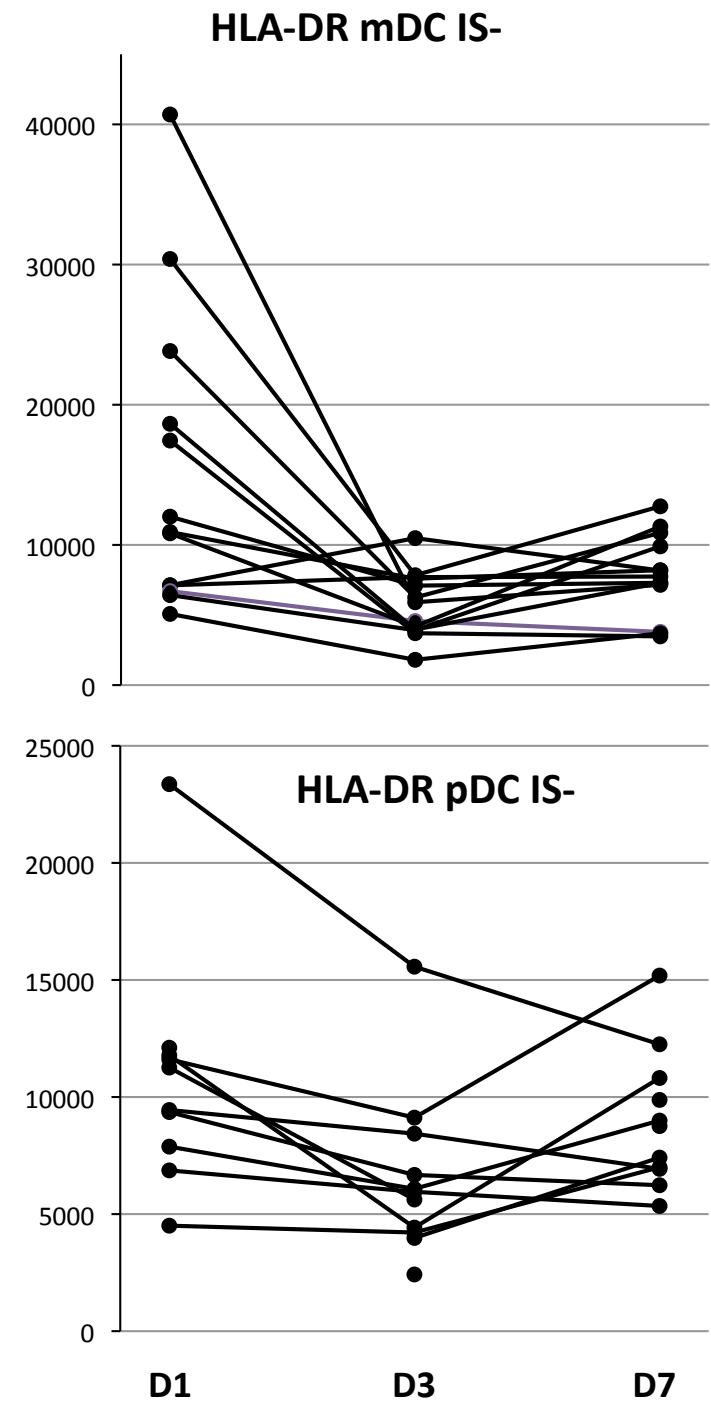
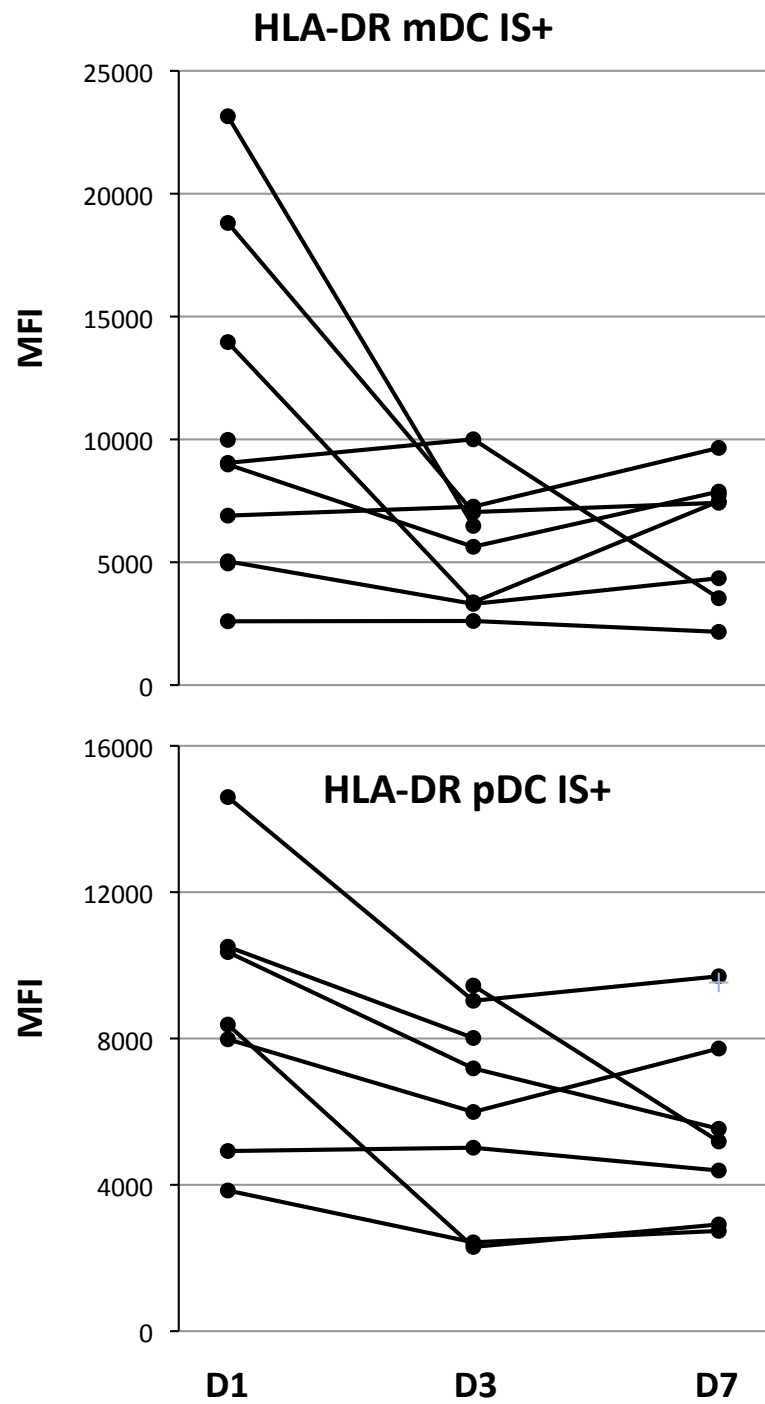


Fig. S5



Chapitre 2:

Le sepsis sévère induit une déplétion spécifique des cellules MAIT parmi les lymphocytes T « de type innés »

Specific MAIT-cells behaviour among innate-like T-lymphocytes in critically ill patients with severe infections

D Grimaldi, L Le Bourhis, B Sauneuf, A Dechartres, C Rousseau, F Ouaaz, M Milder, D Louis, JDI Chiche, JP Mira, O Lantz, F Pène

Accepté pour publication dans Intensive Care Medicine

Cette deuxième étude translationnelle menée en collaboration avec le groupe du Dr Olivier Lantz à Curie, visait à étudier les lymphocytes innés et leur comportement chez l'homme au cours des infections sévères. En utilisant la cytométrie en flux, nous avons pu évaluer de façon reproductible les 3 principales populations de lymphocytes T innés circulantes : les lymphocytes $\gamma\delta$, les lymphocytes NKT et les lymphocytes MAIT, grâce à une combinaison de 7 anticorps monoclonaux. Les lymphocytes B de type inné n'ont pas été étudiés en raison de leur expression quasi-exclusivement tissulaire. Suite à une publication récente (209), décrivant une nouvelle population de lymphocytes B innés principalement chez la souris (cf chapitre 3 de l'introduction), nous avons essayé de mettre en évidence des lymphocytes B circulants sécrétant du GM-CSF chez des témoins que chez des patients infectés mais ces lymphocytes n'étaient pas détectables en périphérie (données non publiées).

Parmi les 3 populations de lymphocytes T de type innés que nous avons choisi d'étudier, seules les lymphocytes $\gamma\delta$ avaient été étudiés chez le patient de réanimation à notre connaissance (214). Notre étude apporte ainsi des données humaines originales pour les lymphocytes MAIT et NKT.

Les 2 principaux objectifs de cette étude étaient : i) étudier l'évolution des numérations circulantes de ces populations lymphocytaires au cours des infections sévères par rapport à des patients contrôles et ii) de rechercher un lien entre modifications éventuelles et survenue d'infections secondaires au cours du séjour en réanimation. Par ailleurs, les lymphocytes MAIT sont caractérisés *in vitro* par une réactivité microbienne sélective incluant les levures et la plupart des bactéries, à l'exception notable des virus et des bactéries de type streptocoque. L'objectif secondaire de l'étude était d'étudier la numération des MAIT circulantes en fonction du type de pathogène.

Nous avons inclus 113 patients avec une infection sévère présumée bactérienne, 36 avec un choc non infectieux et 26 témoins (Tableau 1). Sept patients admis en réanimation au cours de la période de l'étude pour une infection virale documentée et isolée ont également été inclus. Comme pour notre première étude sur les CDs circulantes, la cohorte de patients avec un sepsis sévère/choc septique avait, un âge moyen nettement supérieur à l'âge moyen des donneurs de sang. Nous avons donc constitué un groupe de contrôles « sains » en incluant d'une part des patients hospitalisés dans le service d'ophtalmologie en chirurgie ambulatoire à l'hôpital Cochin en excluant tous les patients ayant des co-morbidités lourdes, et d'autre part des volontaires sains pour obtenir un âge comparable aux cohortes de patients. Les patients de réanimation étaient prélevés le lendemain de leur admission et à J3-4 et à J7-8. Un seul prélèvement était réalisé chez les contrôles sains.

Les principaux résultats de notre étude peuvent se résumer ainsi :

- A J1 de l'admission en réanimation, le nombre de lymphocyte MAIT circulants est diminué chez les patients admis pour une infection sévère en comparaison avec les contrôles sains et en comparaison avec les patients admis pour choc non infectieux. (Figure 1A). Cette différence en compte absolu était confirmée lorsque la numération des MAIT était exprimée en pourcentage des lymphocytes conventionnels $\alpha\beta$ (Figure 1B). Une analyse multivariée a confirmé qu'une infection sévère était un facteur indépendant associé à une diminution des MAIT circulants (tableau 2).
- A J1, il n'y avait pas de différence dans la numération des lymphocytes $\gamma\delta$ et des lymphocytes NKT entre les patients admis pour infection grave et les patients admis pour choc non infectieux. Les lymphocytes $\gamma\delta$ étaient diminués chez tous les patients par rapport aux contrôles sains (figure supplémentaires 3A & 3B).

- La diminution des MAIT circulants dépend de la nature du pathogène impliqué. En effet, les patients infectés à une bactérie qui n'active pas les MAIT *in vitro* (*streptococcaceae* et *Listeria sp.*) ont une numération de MAIT plus élevée que les patients infectés avec d'autres bactéries (Figure 2). De façon démonstrative, quelques patients avec infection virale pure avaient des MAIT comparables aux témoins sains même si le faible effectif ne permet pas une comparaison statistique.
- L'observation de l'évolution de la numération des MAIT montre que les MAIT restent bas au cours du séjour en réanimation chez les patients initialement infectés. En utilisant une analyse de risque compétitif prenant en compte le risque d'acquisition d'une infection en réanimation (absent chez les patients décédés et ceux sortant de réanimation) l'absence d'augmentation des MAIT était associée à la survenue d'infections secondaires acquises en réanimation (Figure 3). Ce phénomène ne s'observait pas pour les lymphocytes NKT ou les lymphocytes $\gamma\delta$ (données supplémentaires).

Notre étude suggère que les MAIT sont impliqués spécifiquement dans la réponse anti-infectieuse par rapport aux autres populations de lymphocytes T innés. Par ailleurs, elle suggère que la baisse prolongée des MAIT est associée à une augmentation du risque d'infection secondaire. Il est intéressant de noter les points communs méthodologiques et les différences d'approche par rapport à l'étude précédente sur les cellules dendritiques.

- Dans cette étude, nous avons choisi d'inclure des patients présentant un sepsis sévère sans choc septique. En effet, les données existantes suggéraient qu'une diminution des MAIT était observée chez des patients présentant une infection peu sévère. Il était logique de supposer que cette diminution s'observerait en cas de sepsis sévère même sans choc. Ceci nous a permis par ailleurs d'avoir un rythme d'enrôlement important.
- Nous avons exclus les patients admis après un arrêt cardiaque extra-hospitalier du groupe des patients avec choc non infectieux car des données récentes amènent à penser que ces

**Specific MAIT-cells behaviour among innate-like T-lymphocytes in critically ill patients
with severe infections**

David Grimaldi ^{1,2,3,4,5}, Lionel Le Bourhis ^{6,7,8}, Bertrand Sauneuf ¹, Agnès Dechartres ^{4,9},
Christophe Rousseau ^{2,3,4}, Fatah Ouaz ^{2,3,4}, Maud Milder ^{6,7,8}, Delphine Louis ^{6,7,8},
Jean-Daniel Chiche ^{1,2,3,4}, Jean-Paul Mira ^{1,2,3,4}, Olivier Lantz ^{6,7,8}, Frédéric Pène ^{1,2,3,4}

- 1. Réanimation médicale, Hôpital Cochin AP-HP, Paris, France
- 2. Institut Cochin INSERM U1016, Paris France
- 3. CNRS UMR8104, Paris, France
- 4. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
- 5. Réanimation médico-chirurgicale, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay France
- 6. Institut Curie, Biologie des Tumeurs, Paris, France
- 7. INSERM U932, Paris, France
- 8. Centre d’investigation clinique CICBT507, Institut Curie / Institut Gustave Roussy, Paris, France
- 9. Centre d’épidémiologie clinique, Hôpital Hotel-Dieu, AP-HP, Paris, France

Corresponding author: Dr Frédéric Pène, Réanimation médicale, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France.

Tel: +33158414677 Fax: +33158412505 Email: frederic.pene@cch.aphp.fr

Running title: MAIT-cells during severe infections
Manuscript word count: 3200
Abstract word count: 250

Key words:

innate-like lymphocytes

septic shock

nosocomial infection

sepsis-induced immunosuppression

Article's main point

The innate-like lymphocytes called Mucosal associated invariant T-cells (MAIT) are decreased in patients with severe bacterial infections and their changes over time impact the further development of ICU-acquired infections. These results appear specific of MAIT-cells among other innate-like T lymphocytes and add MAIT-cells depletion to the spectrum of sepsis-induced immunosuppression.

Abstract

Purpose: In between innate and adaptive immunity, the recently identified innate-like Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) lymphocytes display specific reactivity to non-streptococcal bacteria. Whether they are involved in bacterial sepsis has not been investigated.

We aimed to assess the number and the time course of circulating innate-like T lymphocytes (MAIT, NKT- and $\gamma\delta$ T-cells) in critically ill septic and non-septic patients and to establish correlations with the further development of intensive care unit (ICU)-acquired infections.

Methods: We prospectively enrolled consecutive patients with severe sepsis and septic shock. Controls were critically ill patients with non-septic shock and age-matched healthy subjects. Circulating innate-like lymphocytes were enumerated using a flow cytometry assay at day 1, 4 and 7.

Results: 156 patients (113 severe bacterial infections, 36 non-infected patients and 7 patients with severe viral infections) and 26 healthy subjects were enrolled into the study. Patients with severe bacterial infections displayed an early decrease in MAIT cell count (median $1.3/\text{mm}^3$; interquartile range (0.4-3.2)) as compared to control healthy subjects ($31.1/\text{mm}^3$ (12.1-45.2)), but also to non-infected critically ill patients ($4.3/\text{mm}^3$ (1.4-13.2)) ($P < 0.0001$ for all comparisons). In contrast NKT- and $\gamma\delta$ T-cell counts did not differ between patients groups. The multivariate analysis identified non-streptococcal bacterial infection as an independent determinant of decrease in MAIT-cell count. Furthermore, the incidence of ICU-acquired infections was higher in patients with persistent MAIT-cell depletion.

Conclusions: This large human study brings valuable information about MAIT-cells in severe bacterial infections. The persistent depletion of MAIT-cells is associated with the further development of ICU-acquired infections.

Introduction

Severe sepsis represents the life-threatening inflammatory response to infection, most often of bacterial origin. Tissue invasion by pathogens triggers a potent inflammatory response required for efficient destruction of the microorganism. It is assumed that dysregulated innate immune response is the main determinant of severe sepsis, resulting in tissue damage, infection spread with systemic inflammation and multiple organ failure but the contribution of adaptive immune cells to the septic process remains unclear. In between innate and adaptive immunity, the so-called “innate-like” lymphocytes comprise B- and T-cells characterized by the recurrent expression of B-cell and T-cell antigen receptors with limited diversities. Innate-like T-cell lymphocytes comprise $\gamma\delta$ T-cells, Natural Killer T (NKT) cells and the recently identified Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) cells. Only MAIT and NKT-cells display phylogenetic conservation of an invariant TCR α chain and restriction in MHC class Ib molecules (MR1 and CD1d, respectively) [1]. Innate-like lymphocytes have elevated clonal sizes in steady-state conditions and are readily available in order to display immediate effector functions [2-5]. Among them, MAIT and $\gamma\delta$ T-cells are particularly abundant in human blood, accounting for 1-8% and 1-10% of T cells respectively, while NKT represent 0.01-0.5% of T-cells.

Recent reports highlighted the particular antimicrobial properties of MAIT-cells. They are specifically activated in the presence of antigen-presenting cells infected with a wide variety of microbes including yeasts, Gram-negative and Gram-positive bacteria. Of note, MAIT-cells fail to respond to streptococcal and enterococcal bacteria and to viruses [6]. In addition, MAIT-cells express high levels of the multi-drug transporter protein, suggesting that they could be resistant to xenobiotics secreted by bacteria [7]. MAIT cell activation occurs within hours of bacteria phagocytosis by antigen-presenting cells and depends on a cognate interaction between the invariant TCR and MR1. As a result, MAIT-cells secrete high

1 amounts of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-17. In mice, MAIT-cells
2 accumulate at the site of infection and protect against bacterial and mycobacterial infections
3
4 [6].
5
6

7 Altogether, these experimental findings suggest a role of MAIT-cells in the early stages of
8 bacterial infections [8]. We performed a prospective study aimed to characterize MAIT along
9 with NKT- and $\gamma\delta$ T-cells in critically ill patients according to the type of injury (severe
10 bacterial infection vs. non-septic disorders) and to the type of causing pathogen in septic
11 patients (non-streptococcal vs. streptococcal infections). In addition, we sought for an
12 association between the time course of innate-like T-lymphocyte counts and the further
13 development of ICU-acquired infections in critically ill patients. Part of this study has been
14 previously reported in the form of abstract [9].
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Patients and methods**

28 *Patients and controls*

29
30 Patients with community-acquired severe sepsis/septic shock made up the group of
31 critically ill infected patients [10]. Among them, those with a definitive diagnosis of viral
32 infection documented by PCR or serology in the absence of concomitant bacterial infection
33 were analysed separately. The other septic patients were classified as bacterial sepsis and *a*
34 *priori* classified in two groups with or without streptococcal infections. Patients with non-
35 septic shock made up the group of critically ill non-infected patients. We also enrolled healthy
36 volunteers and elderly subjects scheduled for elective cataract surgery to build a control
37 cohort age-matched to infected patients.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 Exclusion criteria were age < 18 y.o., pregnancy, presence of do-not-resuscitate orders on
53 admission, congenital or acquired immunodeficiency and any infection requiring
54 hospitalization within the last month prior to ICU admission. Patients and healthy controls
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 were included after personal or next of kin's informed consent. The study was approved by
2 the institutional ethics committee (CPP Ile-de-France 3, decision number S.C. 2855).
3
4
5
6

7 *Data collection*

8
9 All variables obtained during routine patient care were prospectively recorded using the
10 patient data management system (Centricity Clinisoft[®], GE Healthcare). ICU-acquired
11 infections were defined as new-onset infections not present at the time of admission and
12 developing until day 3 in the ICU, and were diagnosed according to the current guidelines
13 [11, 12].
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 *Innate-like lymphocyte analysis*

25
26 Total circulating lymphocytes and innate-like T cells (MAIT, NKT and $\gamma\delta$ T-cells) were
27 enumerated at day 1 (D1) following ICU admission, and then at D3-4 and D7-8 when
28 available. Innate-like T-cells were quantified in the whole blood by a multiple-staining flow-
29 cytometry assay. MAIT-cells were identified as $CD3^+ TCR\gamma\delta^- CD4^- CD161^{hi} V\alpha 7.2^+$ cells
30 [7]; $\gamma\delta$ lymphocytes were identified as $CD3^+ TCR\gamma\delta^+$ cells; NKT-cells were identified as
31 $CD3^+ TCR\gamma\delta^- CD161^{hi} V\alpha 24^+$ cells. A representative example of gating strategy is given in
32 the supplementary material (supplementary figure 1). Innate-like lymphocyte counts were
33 expressed as absolute and relative values, MAIT- and NKT-cells being expressed as
34 percentage of $CD3^+ TCR\gamma\delta^-$ lymphocytes and $\gamma\delta$ T-cells as percentage of total lymphocytes.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 *Statistical analysis*

52
53 Categorical data were presented as numbers (%) and continuous variables as median
54 (interquartile range). The percentage of innate-like T-cells was transformed using a log10
55 base to perform statistical analysis. Comparison of innate-like T-cells counts between
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

patients' groups was done using ANOVA with Tukey post-hoc tests. A general multivariate linear regression model was carried out to estimate the independent determinants of day-1 percentage of MAIT-cells.

We estimated the cumulative incidence of ICU-acquired infections over time by taking into account the two other competitive events (discharge alive and death). We performed a landmark survival analysis [13]. We *a priori* set the time zero at four days after ICU admission. Using the Fine and Gray method [14] for competitive risks, we compared the cumulative probability of ICU-acquired infections from landmark (day 4) between patients with and without decrease in MAIT-cell counts over the first four days in the ICU . All tests were two-sided, and a P value <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed with R version 2.15.1 (R development core Team 2012).

Detailed methods are available in the online supplementary material.

Results

Population characteristics

156 patients were enrolled into the study between June 2010 and March 2012 (supplementary figure 2). Patients' characteristics are shown in the table 1. Among the 113 patients with a diagnosis of bacterial infection, 82 (72.6%) required vasopressive support and fulfilled the criteria of septic shock while the others had severe sepsis. 85 (75.2%) patients had community-acquired sepsis and pneumonia was the leading source of infection. Sepsis was microbiologically documented in 88 (78.0%) patients, of whom 32 (30.5%) had a bacteraemia. 58 (51.3%) patients had Gram-positive infections including 37 (63.8%) due to *Streptococcus sp.* or *Enterococcus sp.* In comparison with critically ill non-infected patients, bacterial sepsis patients were slightly younger, with a predominance of men, and presented

1 similar severity as assessed by SOFA score. Admission lymphocyte count was lower in
2 patients with bacterial infections. The in-ICU-survival was better in septic patients compared
3 to non-infected patients.
4
5
6
7
8

9 *Patients with bacterial infections display a marked decrease in circulating MAIT-cells*

10
11 As shown in the figure 1A and in supplementary table 1, patients with severe bacterial
12 infections displayed an early decrease in MAIT-cell count as compared to control healthy
13 subjects ($P<0.0001$), but also to critically ill non-infected patients ($P<0.0001$). Of note,
14 critically ill non-infected patients also displayed a substantial although less pronounced
15 decrease of MAIT-cell numbers as compared to healthy controls ($P<0.0001$). Since total
16 lymphocyte counts differed between the different groups, we ensured these results by
17 comparing the proportion of MAIT-cells among $CD3^{+} \gamma\delta^{-}$ conventional T-cells (figure 1B).
18 The proportion of MAIT-cells remained significantly lower in septic patients as compared to
19 healthy control subjects ($P<0.0001$), while it nearly reached significance when compared to
20 critically ill non-infected patients ($P=0.09$). Besides infection status, a number of variables
21 including age, gender and the presence of comorbidities were associated with decreased
22 MAIT proportion in patients at day 1 (table 2). The multivariate analysis identified the
23 presence of bacterial infection as an independent determinant of MAIT proportion at day 1
24 ($P=0.02$) (table 2, model 1). Of note, MAIT-cell proportions were similar between patients
25 with severe sepsis or septic shock (0.75% (0.30-1.20) vs 0.46% (0.20-1.50) respectively,
26 $P=0.68$) and administration of hydrocortisone did not influence MAIT-cell counts when
27 forced into the multivariate linear regression model (data not shown).
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Assessment of NKT-cells and $\gamma\delta$ T-cells in critically ill patients

We aimed to determine the specificity of MAIT-cells changes among other innate-like T-lymphocytes such NKT-cells and $\gamma\delta$ T-cells. The proportions of NKT-cells were not modified in septic and critically ill non-infected patients as compared to healthy controls (supplementary figure 3A). In contrast, the proportions of $\gamma\delta$ T-cells similarly decreased in both patient groups regardless of their infection status (supplementary figure 3B).

The type of pathogen affects the depth of MAIT-cell decrease

MAIT-cells exhibit a specific anti-bacterial reactivity *in vitro*, with the notable exception of *Streptococcus* sp. Therefore we compared the subgroups of septic patients with or without streptococcal infections (figure 2). As compared to patients with non-streptococcal infections, the day-1 decrease in MAIT-cells was less pronounced in those with streptococcal infections ($P=0.026$), albeit a significant overlap between both groups. A multivariate analysis taking into account the type of bacteria (*Streptococcus* or non-*Streptococcus*) demonstrated that only age and non-streptococcal infections remained independent determinants of MAIT-cell decrease (table 2, model 2). Accordingly, non-streptococcal sepsis remained independently associated with decrease in MAIT-cells among infected patients (estimate -0.22, 95% CI (-0.43 ; -0.005), $P=0.04$). Of note, the proportions of NKT- and $\gamma\delta$ T-cells did not differ between patients with or without streptococcal infections (figure 2).

Furthermore, to enforce the pathogen-dependence of MAIT-cell decrease, we addressed MAIT cell counts in the seven patients with severe viral infection without any concomitant bacterial infection at the time of ICU admission. Interestingly, we observed that their proportions of MAIT-cells were strikingly higher than those of patients with bacterial infections. NKT- and $\gamma\delta$ T-cells proportions were similar to those of patients with bacterial infections (supplementary table 1).

Changes in MAIT-cells over time impact the development of ICU-acquired infections

32 patients developed ICU-acquired infections at a median time of eight days after admission (supplementary tables 2 & 3). To analyse the potential association between changes in MAIT-cell counts and the occurrence of ICU-acquired infections, we performed a competitive risk analysis with a landmark strategy that takes into account the situations of death or discharge alive that obviously prevent the development of ICU-acquired infections. The cumulative incidence of ICU-acquired infections was higher in patients who did not increase MAIT-cell counts between day 1 and day 4 (figure 3). Accordingly, patients who remained free of ICU-acquired infections displayed a progressive increase in MAIT-cells over the first seven days (supplementary figure 4). In contrast, changes in NKT-, $\gamma\delta$ T-cells and total T-cell lymphocytes did not affect the incidence of ICU-acquired infections (supplementary figure 5).

Discussion

In between innate and adaptive immunity, innate-like lymphocytes display fast activation upon microbial infection and then rapidly express effector mechanisms including potent cytokine production that contribute to innate host defence [2]. Among them, the recently identified MAIT-cells subset carries specific bacterial reactivity in vitro [6]. Most of our knowledge about the behaviour of MAIT-cells towards infection lies in experimental data that require validation in clinical settings. In this large human study, we observed that severe bacterial infections was associated with a dramatic drop in MAIT-cell count, as compared to other innate-like lymphocytes such as NKT and $\gamma\delta$ T-cells. First, an early decrease in MAIT-cell counts was commonly observed in critically ill patients but was particularly marked in those with severe sepsis. Second, the magnitude of MAIT-cell decrease depended on the nature of the pathogen, and was therefore more pronounced in patients with non-streptococcal

infections. Third, the development of ICU-acquired infections sustained MAIT-cell decrease throughout the first four days, while those without secondary infections increased MAIT-cell counts in the same time.

The most striking finding of our study was the early and dramatic decrease in circulating MAIT-cells in patients with severe bacterial sepsis as compared to age-related healthy subjects and to non-infected critically ill patients. Together with the demonstration of *in vitro* bacterial reactivity of MAIT-cells, our findings confirm that MAIT-cells are involved in the host response to bacterial infection. Interestingly, the MAIT-cell counts were not associated with total lymphocyte counts suggesting that these cells behave independently from mainstream lymphocytes during severe infections. Importantly, MAIT-cells carry the property of reactivity to a wide range of Gram-positive and -negative bacteria, mycobacteria and yeasts, but not to viruses. The putative bacterial ligand that determines MAIT-cell activation has recently been identified as a vitamin B metabolite [15]. Of note, *Streptococci* species (including *Enterococci*) and *Listeria sp.* are unable to activate MAIT-cells [6] although this specificity is not yet understood. In line with these intrinsic properties, MAIT-cell counts remained significantly higher in patients infected with streptococcal bacteria even after adjustment with potential confounders. In the same way, six out of seven patients with severe viral infections free of concomitant bacterial infections displayed high levels of MAIT-cells, similar to those of healthy controls. Nevertheless, changes in blood or tissue distribution of MAIT cells have already been observed in HIV infection or hepatitis C suggesting that these cells might still be involved in the immune pathogenesis of chronic viral infections [16, 17].

As we aimed to compare patients with severe sepsis to non-infected patients with a same degree of severity, we also enrolled into the study some critically ill non-infected patients

1 with non-infectious shock (mostly cardiogenic shock). As compared to healthy control
2 subjects, critically ill non-infected patients displayed decreased MAIT-cell counts, although in
3 a less pronounced manner than septic patients. Since we found that MAIT-cell count is
4 inversely correlated with age in healthy subjects, this finding could be explained by the
5 advanced age of non-infected patients but it also might support the pathophysiological
6 continuum in acute inflammatory disorders regardless of the type of injury. Indeed sepsis and
7 non-infective disorders share common mechanisms likely to sustain the inflammatory process
8 such as endogenous danger signals, endotoxemia despite the absence of patent infection, or
9 bacterial translocation from the gut [18].
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 Another interesting finding of our study was the association between sustained MAIT-
25 cell decrease and the development of ICU-acquired infections. Indeed, circulating MAIT-cells
26 increased progressively in patients who did not develop any ICU-acquired infection
27 suggesting that sepsis-induced MAIT-cell depletion is a transient phenomenon. In contrast,
28 circulating MAIT-cells remained low and even dropped in patients who developed secondary
29 infections. This enforces the infection-induced modulation of MAIT-cell count. Whether the
30 persistent decrease in MAIT-cells at day 4 is a cause or a consequence of ICU-acquired
31 infections remains questionable. However, these biological changes occurred relatively long
32 before the onset of secondary infections at a median of eight days. The limited sample size
33 precluded a multivariate analysis taking into account the clinical risk factors of ICU-acquired
34 infections. The impact of sepsis-induced immune defects on the susceptibility to secondary
35 infections was already reported for dendritic cell depletion [19], monocytic deactivation [20-
36 22] and expression of the inhibitory programmed death-1 molecule by CD4⁺ T-cells [23]. The
37 integrate role of MAIT-cells in the complex puzzle of post-aggressive immunosuppression
38 remains to be clarified [24]. More generally, a comprehensive assessment of the role of post-
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

aggressive immunosuppression in the development of ICU-acquired infections would now require the confrontation of these emergent markers to each other and to other common clinical risk factors.

Only a few experimental studies have already investigated the effective contribution of MAIT-cells to antibacterial host defence. MR1-deficient mice, which are unable to activate MAIT-cells, display increased susceptibility to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and to *Mycobacterium abscessus* infections, related to impaired pathogen clearance [25, 26]. In addition, MR1-sufficient, iV α 19-transgenic and V β 6-transgenic mice, which express high number of MAIT-cells, exhibit improved pathogen clearance as compared to MR1-deficient counterparts [6]. However, the effector antibacterial mechanisms mediated by MAIT-cells remain largely unknown. Human MAIT-cells retains high production of pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IFN γ or IL-17 [7]. Accordingly, MR1-deficient mice display decreased production of pro-inflammatory cytokines in response to *K. pneumoniae* infection [25]. Nevertheless, variations in cytokine productions are unlikely to fully explain the outcome differences between MAIT-deficient and –sufficient mice.

Besides MAIT-cells, other innate-like lymphocytes such as NKT- and $\gamma\delta$ T-cells have been potentially involved in host response to infections. NKT-cells are abundant in mice and have been reported to play a role in different models. They are able to recognize microbial-derived lipid bacterial antigen from peculiar pathogens like *Sphingomonas sp.* [27, 28], *Erlichia muris* [27], or *Borrelia burgdoferi* [29]. In addition NKT-cells may recognize a glycolipid from *Streptococcus pneumoniae* [30]. NKT-cells are potent producers of IFN γ and other pro-inflammatory cytokines as well as Th-2-related cytokines such as IL-4, with conflicting resulting effects in experimental models of sepsis. On one hand, NKT-cells may

1 contribute to the overwhelming inflammatory response to endotoxemia and polymicrobial
2 sepsis and to the related mortality. On the other, these cells may facilitate pathogen clearance
3 in bacterial sepsis. Whereas the implication of these cells remains to be clarified in animal
4 models of infections [31], there is to date no evidence for their involvement in human sepsis.
5
6 We here report for the first time an assessment of circulating NKT-cells in severely infected
7 humans. Interestingly, we did not observe any quantitative changes in circulating NKT-cells
8 during the course of severe infections due to common bacteria as well as in non-infective
9 acute inflammatory disorders. $\gamma\delta$ T-cells are preferentially localized in mucosal organs
10 containing epithelia and are thought to be activated by endogenous ligands expressed upon
11 tissue damage [27]. Several studies reported a decrease of circulating $\gamma\delta$ -cells in a small
12 cohort of septic shock patients as compared to healthy controls [32], but also in patients with
13 burn injury [33] and in trauma patients [34]. We confirmed these observations in the present
14 study, as infected and non-infected critically ill patients displayed similar decrease in $\gamma\delta$ -cell
15 counts as compared to healthy subjects.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Our study has several strengths and limitations. The large number of patients allowed
37 multivariate adjustment with potential confounders. Most importantly, we strengthened our
38 findings in septic patients by comparing them not only to age-related healthy control subjects,
39 but also to non-infected critically ill patients. We also assessed changes in other innate-like T
40 lymphocyte subsets in order to enforce the specificity of infection-induced changes in MAIT-
41 cells. The major limitation of our study lies in the absence of comprehensive exploration of
42 mechanisms that drive the early decrease in MAIT-cells. Apoptotic cell death and migration
43 into infected or injured tissues represent two potential mechanisms. Extensive apoptosis of T
44 and B lymphocyte is a hallmark of sepsis [35], and leads to altered distribution of lymphocyte
45 subsets towards a relative expansion of regulatory T-cells [36]. However an accurate
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 exploration of MAIT cell apoptosis was highly limited in the present study because this subset
2 was very low or virtually absent in most septic patients. A few clinical data support the
3 migration hypothesis. Le Bourhis and coll. reported that MAIT-cells could be observed in
4 lung lesions from two patients with pulmonary tuberculosis [6]. Accordingly, MAIT cell
5 migration into infected tissues was suggested in a few patients from the present study by the
6 presence of higher proportion of MAIT-cells in biological fluids than in whole blood (data not
7 shown). Finally, we were not able to perform measurements several weeks or months after
8 discharge from the ICU. This prevented us to determine whether and when MAIT cell levels
9 normalize after recovery.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 **Conclusion**

26 This large human study brings valuable information about MAIT-cells in severe bacterial
27 infections and non-infectious severe disorders in critically ill patients. The depletion in
28 MAIT-cells may add to the spectrum of post-aggressive immune defects. The mechanisms of
29 circulating MAIT cell depletion and whether these cells actively contribute to antibacterial
30 defence in clinical settings remain to be investigated.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgements

We are indebted to Professor A. Brezin (department of Ophtalmology, Cochin hospital) for including age-matched control subjects, Dr N. Chapuis (Hematology laboratory, Cochin hospital) and the Cochin Cytometry and Immunobiology Facility for technical help.

This work was supported by grants from the European Society of Intensive Care Medicine (ECCRN Clinical Research Award 2010) and from the French Health department (Inserm/DGOS 2011). D.G. was a recipient of a “Poste d’Accueil CNRS-CEA/APHP.” The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflicts of interest

D.G., L.L.B., B.S., A.D., C.R., F.O., M.M., D.L.: no conflict

J.P.M. has been a consultant to MSD, LFB, Astrazeneca, Astellas, Eli Lilly and Brahms and has received research funding from Eli Lilly.

O.L. received royalties from Biolegend for the anti-V α 7.2 antibody.

F.P. gave lecture for LFB.

J.D.C is the current president of European Society of Intensive Care Medicine

References

1. Treiner E, Lantz O, (2006) CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Curr Opin Immunol* 18: 519-526
2. Bendelac A, Bonneville M, Kearney JF, (2001) Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 1: 177-186
3. Bonneville M, Scotet E, (2006) Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol* 18: 539-546
4. Kawachi I, Maldonado J, Strader C, Gilfillan S, (2006) MR1-restricted V alpha 19i mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol* 176: 1618-1627
5. Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T, (2006) Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 7: 987-994
6. Le Bourhis L, Martin E, Peguillet I, Guihot A, Froux N, Core M, Levy E, Dusseaux M, Meyssonier V, Premel V, Ngo C, Riteau B, Duban L, Robert D, Huang S, Rottman M, Soudais C, Lantz O, (2010) Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* 11: 701-708
7. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Peguillet I, Premel V, Louis D, Milder M, Le Bourhis L, Soudais C, Treiner E, Lantz O, (2011) Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 117: 1250-1259
8. Le Bourhis L, Guerri L, Dusseaux M, Martin E, Soudais C, Lantz O, (2011) Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends immunol* 32: 212-218
9. Grimaldi D, (2011) Bacterial sepsis induces a profound depletion in circulating mucosal-associated invariant T (MAIT) lymphocytes (Abstract). *Intensive Care Med* 37 Suppl 1:1005
10. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29: 530-538
11. Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad, II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE, (2001) Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin infect dis* 32: 1249-1272
12. (2005) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Resp Crit Care Med* 171: 388-416
13. Anderson JR, Cain KC, Gelber RD, (1983) Analysis of survival by tumor response. *J Clin Oncol* 1: 710-719
14. Fine JP, Gray RJ, (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc* 94: 496-509
15. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, Reantragoon R, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J, (2012) MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 491: 717-723
16. Cosgrove C, Ussher JE, Rauch A, Gartner K, Kurioka A, Huhn MH, Adelmann K, Kang YH, Fergusson JR, Simmonds P, Goulder P, Hansen TH, Fox J, Gunthard HF, Khanna N, Powrie F, Steel A, Gazzard B, Phillips RE, Frater J, Uhlig H, Klenerman

- P, (2013) Early and nonreversible decrease of CD161⁺⁺ /MAIT cells in HIV infection. *Blood* 121: 951-961
17. Billerbeck E, Kang YH, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, Fleming V, Flint J, Willberg CB, Bengsch B, Seigel B, Ramamurthy N, Zitzmann N, Barnes EJ, Thevanayagam J, Bhagwanani A, Leslie A, Oo YH, Kollnberger S, Bowness P, Drognitz O, Adams DH, Blum HE, Thimme R, Klennerman P, (2010) Analysis of CD161 expression on human CD8⁺ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3006-3011
18. Asehnoune K, Roquilly A, Abraham E, (2012) Innate immune dysfunction in trauma patients: from pathophysiology to treatment. *Anesthesiology* 117: 411-416
19. Grimaldi D, Louis S, Pene F, Sirgo G, Rousseau C, Claessens YE, Vimeux L, Cariou A, Mira JP, Hosmalin A, Chiche JD, (2011) Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 37: 1438-1446
20. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, Vanhems P, Monneret G, (2010) Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 36: 1859-1866
21. Lukaszewicz AC, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D, (2009) Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 37: 2746-2752
22. Guignant C, Venet F, Planel S, Demaret J, Gouel-Cheron A, Nougier C, Friggeri A, Allaouchiche B, Lepape A, Monneret G, (2013) Increased MerTK expression in circulating innate immune cells of patients with septic shock. *Intensive Care Med* 39: 1556-1564
23. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, Marcus C, Cheron A, Allaouchiche B, Gueyffier F, Ayala A, Monneret G, Venet F, (2011) Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care* 15: R99
24. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D, (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13: 260-268
25. Georgel P, Radosavljevic M, Macquin C, Bahram S, (2011) The non-conventional MHC class I MR1 molecule controls infection by *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Mol Immunol* 48: 769-775
26. Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, Cansler ME, Vogt TM, Delepine J, Winata E, Swarbrick GM, Chua WJ, Yu YY, Lantz O, Cook MS, Null MD, Jacoby DB, Harrieff MJ, Lewinsohn DA, Hansen TH, Lewinsohn DM, (2010) Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol* 8: e1000407
27. Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C, 3rd, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A, (2005) Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434: 525-529
28. Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing GW, Poles MA, Ho DD, Tsuji M, Kawahara K, Wong CH, Kronenberg M, (2005) Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434: 520-525
29. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, Fujio M, Garcia-Navarro R, Benhnia MR, Zajonc DM, Ben-Menachem G, Ainge GD, Painter GF, Khurana A, Hoebe K, Behar SM, Beutler B,

- Wilson IA, Tsuji M, Sellati TJ, Wong CH, Kronenberg M, (2006) Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 7: 978-986
30. Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, Pei B, Girardi E, Li X, Li Y, Imamura M, Kaneko Y, Okawara A, Miyazaki Y, Gomez-Velasco A, Rogers P, Dahesh S, Uchiyama S, Khurana A, Kawahara K, Yesilkaya H, Andrew PW, Wong CH, Kawakami K, Nizet V, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M, (2011) Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* 12: 966-974
31. Leung B, Harris HW, (2010) NKT cells in sepsis. *Clin Dev Immunol* 2010
32. Venet F, Bohe J, Debard AL, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G, (2005) Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med* 33: 2836-2840
33. Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, Ayala A, (2008) Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leuk Biol* 83: 523-535
34. Deknuydt F, Roquilly A, Cinotti R, Altare F, Asehnoune K, (2013) An in vitro model of mycobacterial granuloma to investigate the immune response in brain-injured patients. *Crit Care Med* 41: 245-254
35. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE, (2009) Cell death. *New Engl J Med* 361: 1570-1583
36. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G, (2004) Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 32: 2329-2331

Table 1: Baseline patients' characteristics

	Severe bacterial infections			Viral infections	Controls	
	Overall n=113	Streptococcal n=37	Non- streptococcal n=76	n=7	Critically ill non- infected patients n=36	Healthy subjects n=26
Female gender	37 (33)	14 (38)	23 (31)	2 (29)	23 (64)	12 (46)
Age, years	65 (51- 75)	63 (51-67)	66 (51-76)	52 (34-54)	71 (58-80)	71 (41-75)
APACHE II	22 (15-31)	20 (15-28)	24.5 (17-32)	14 (11.5-27.5)	26.5 (19-32)	NA
Admission SOFA	10 (6-13)	9 (4-11)	10 (7-13)	5 (4-9)	11 (7-14)	NA
Lymphocytes at day 1 (G/L)	0.60 (0.30-1.00)	0.55 (0.30-1.10)	0.69 (0.33-0.96)	1.00 (0.50-1.20)	1.00 (0.70-1.40)	1.60 (1.30-1.90)
Mechanical ventilation	78 (69)	23 (62)	54 (73)	3 (43)	28 (78)	NA
Vasopressive drugs	82 (72.6)	22 (59.5)	60 (81.1)	2 (28.6)	36 (100)	NA
Reasons for ICU admission ^a	55 pneumonia 19 abdominal sepsis 18 urosepsis 10 meningitis 8 SSTI 7 miscellaneous	27 pneumonia 1 abd. sepsis 2 urosepsis 6 meningitis 1 SSTI 2 miscellaneous	28 pneumonia 18 abd. sepsis 16 urosepsis 4 meningitis 7 SSTI 5 miscellaneous	3 H1N1 2 measles 1 chickenpox 1 HSV encephalitis	26 cardiogenic shock 6 haemorrhagic shock 4 miscellaneous	NA
ICU mortality	16 (14.2)	8 (21.6)	8 (10.5)	1 (14.3)	15 (41.7)	NA

Categorical variables are expressed as number and percentage and continuous variables as median (interquartile range). ^a Some patients had multiple sources of sepsis. Abbreviations: APACHE II, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SSTI, skin and soft tissue infection; ICU, intensive care unit. NA, not applicable.

Table 2: Determinants of day-1 MAIT proportion among T-cells (bivariate and multivariate analyses)

Baseline characteristics	Crude Estimate (95% CI)	P value	Adjusted Estimate (95% CI) Model 1 ^a	P value	Adjusted Estimate (95% CI) Model 2 ^b	P value
Age (per year)	-0.0061 (-0.011, -0.001)	0.02	-0.006 (-0.01, 0.0002)	0.06	-0.006 (-0.01, -0.0003)	0.04
Female gender	-0.14 (-0.33, 0.04)	0.13	-0.08 (-0.28, 0.11)	0.40	-0.08 (-0.28, 0.11)	0.41
Bacterial infection vs critically ill non-infected	-0.22 (-0.43, -0.007)	0.04	-0.27 (-0.50, -0.04)	0.02	NA	NA
Non-streptococcal infection vs critically ill non-infected	-0.31 (-0.53, -0.08)	0.008	NA	NA	-0.33 (-0.58, -0.09)	0.007
Streptococcal infection vs critically ill non-infected	-0.06 (-0.32, 0.20)	0.65			-0.14 (-0.42, 0.14)	0.33
Any comorbidity	-0.20 (-0.42, 0.03)	0.08	-0.12 (-0.37, 0.13)	0.34	-0.07 (-0.32, 0.19)	0.61
History of severe infection	-0.01 (-0.25, 0.22)	0.89				
APACHE II (per point)	-0.007 (-0.02, 0.002)	0.11	-0.004 (-0.01, 0.006)	0.45	-0.003 (-0.01, 0.006)	0.49
Admission SOFA (per point)	-0.002 (-0.02, 0.02)	0.81				
Day-1 Lymphocytes (per G/L)	0.03 (-0.12, 0.18)	0.69	-0.002 (-0.18, 0.14)	0.79	-0.001 (-0.17, 0.15)	0.87
Invasive mechanical ventilation	0.004 (-0.20, 0.21)	0.97				
Hydrocortisone treatment	-0.12 (-0.32, 0.07)	0.21				

Univariate analysis was conducted to identify baseline factors potentially associated with day-1 MAIT-cell counts in patients (Crude estimate).^a A general linear regression model including variables with a P value < 0.20 in the univariate analysis was carried out to estimate the independent determinants of day-1 percentage of MAIT-cells (model 1).^b A second model was built to estimate the respective impacts of non-streptococcal and streptococcal infections on day-1 percentage of MAIT-cells as compared to non-infected patients (model 2) Abbreviations: APACHE II, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; NA, not applicable.

Figure legends

Fig. 1: Early changes in circulating MAIT-cell counts in critically ill patients

MAIT-cell absolute counts (A) and MAIT-cell proportions among conventional T-lymphocytes (B) were quantified in critically ill infected and non-infected patients at day 1 and in healthy subjects. Results are displayed using a log₁₀ scale. Line and whiskers represent the median value and the 25th and 75th percentiles respectively. Comparison between groups was made using ANOVA and post-hoc Tukey analysis after log₁₀-based transformation of MAIT-cell percentages.

Fig. 2: Circulating innate-like T-cell subsets in patients with streptococcal vs. non-streptococcal infections

MAIT-cells, NKT-cells and $\gamma\delta$ T-cells proportions were quantified in patients with severe bacterial infection related to streptococcal (black filling) or non-streptococcal (empty symbols) bacteria. Results are displayed using a log₁₀ scale. Line and whiskers represent the median value and the 25th and 75th percentiles respectively. Comparison between groups was made using ANOVA after log₁₀-based transformation of cell percentages.

Fig. 3: Persistent MAIT-cell depletion is associated with the development of ICU-acquired infections

Landmark survival analysis of cumulative incidence of ICU-acquired infections in the patients with increasing (continuous line) or decreasing (dashed line) MAIT-cell counts between day 1 and 4. The time zero was *a priori* set at four days after ICU admission. Comparison was done using the Fine and Gray test for competitive risk analysis.

Fig. 1A

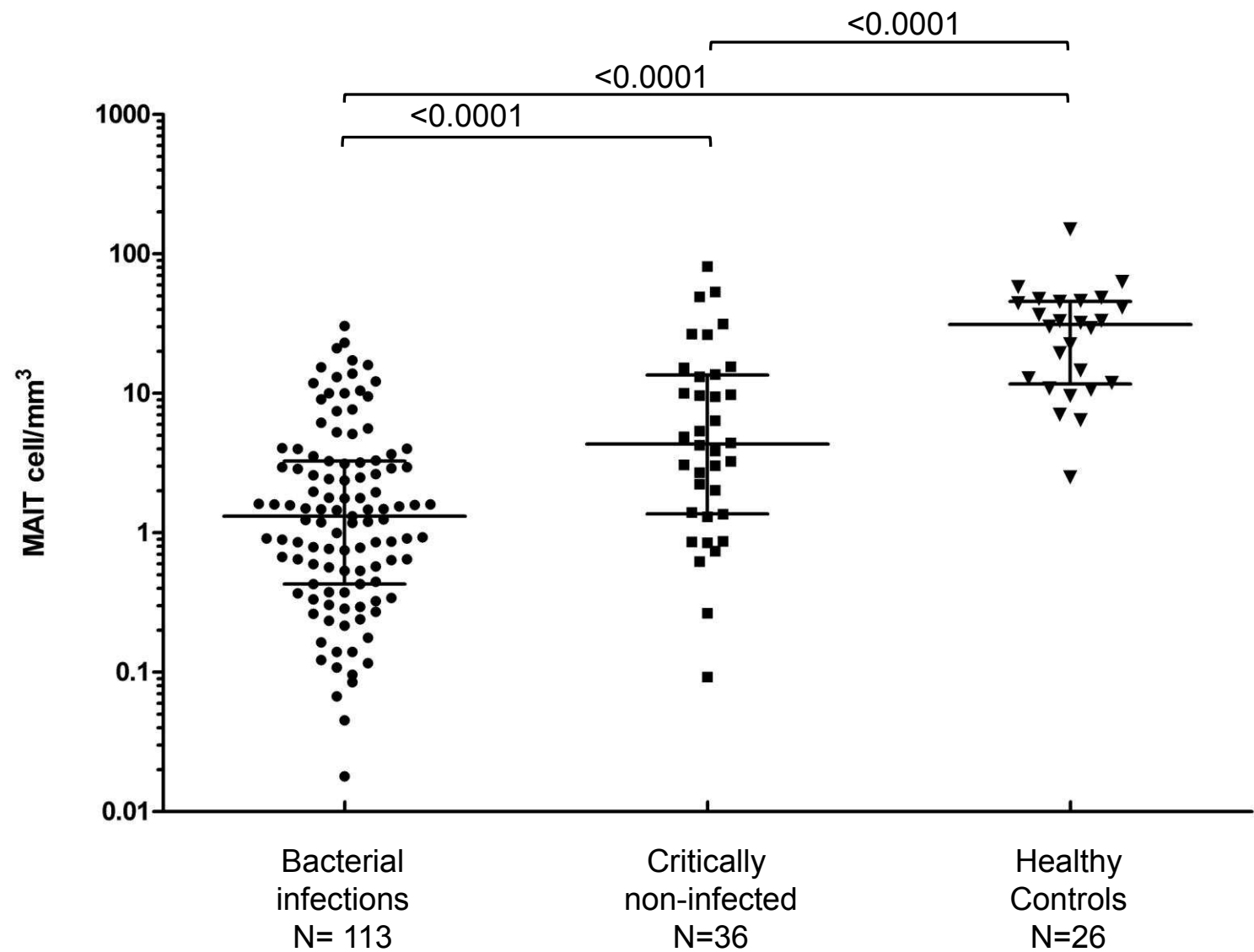


Fig. 1B

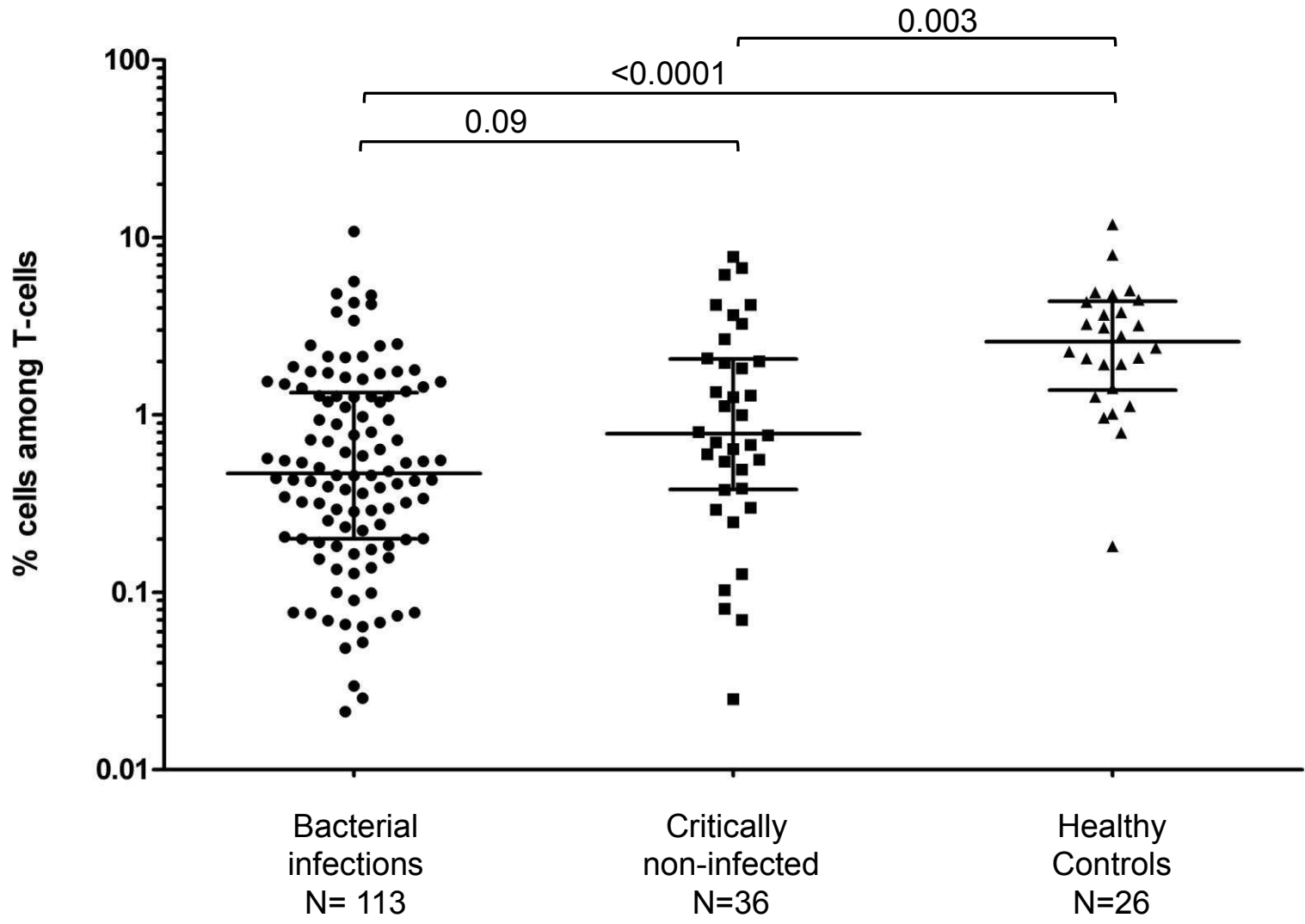


Fig. 2

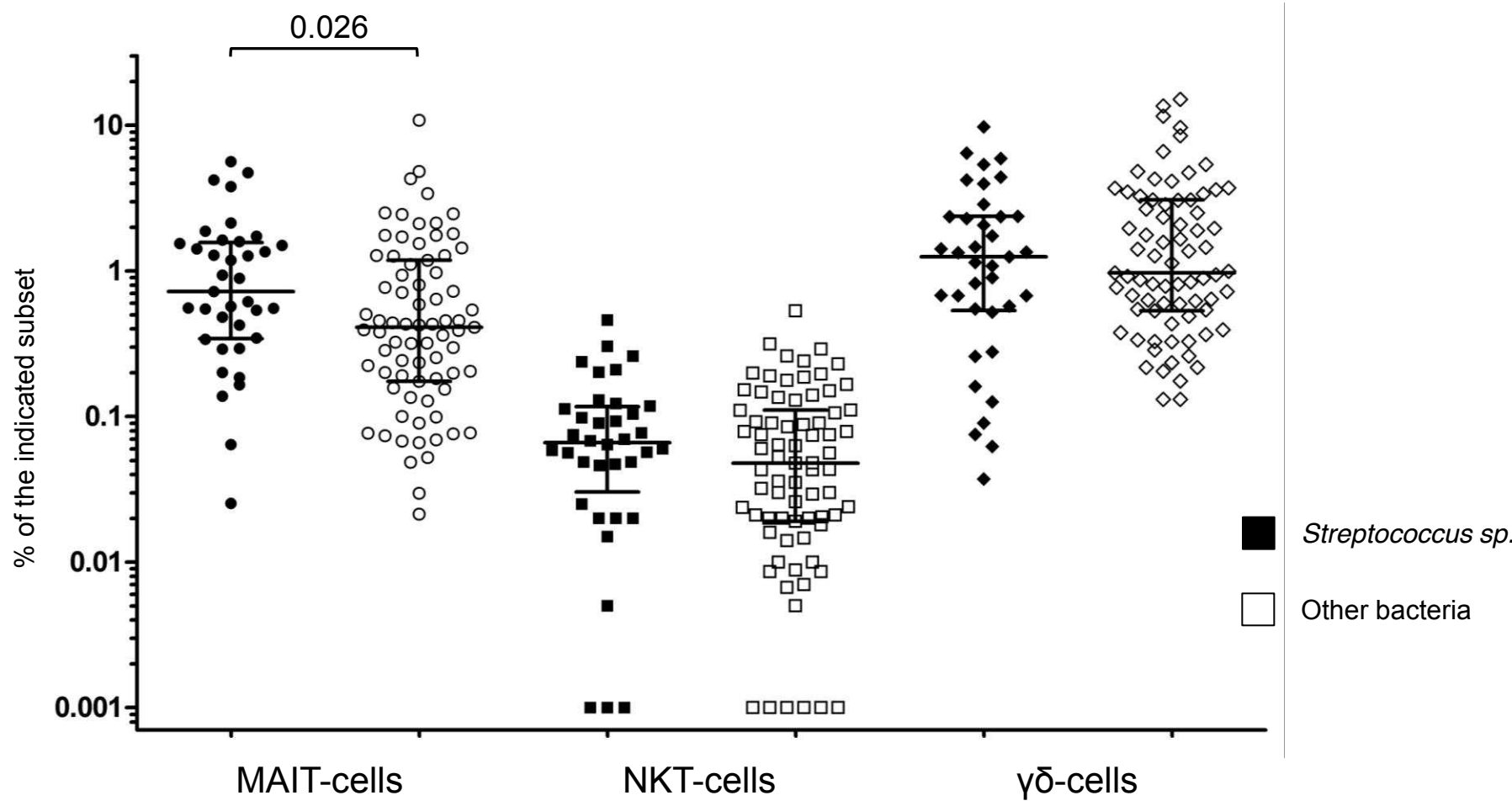
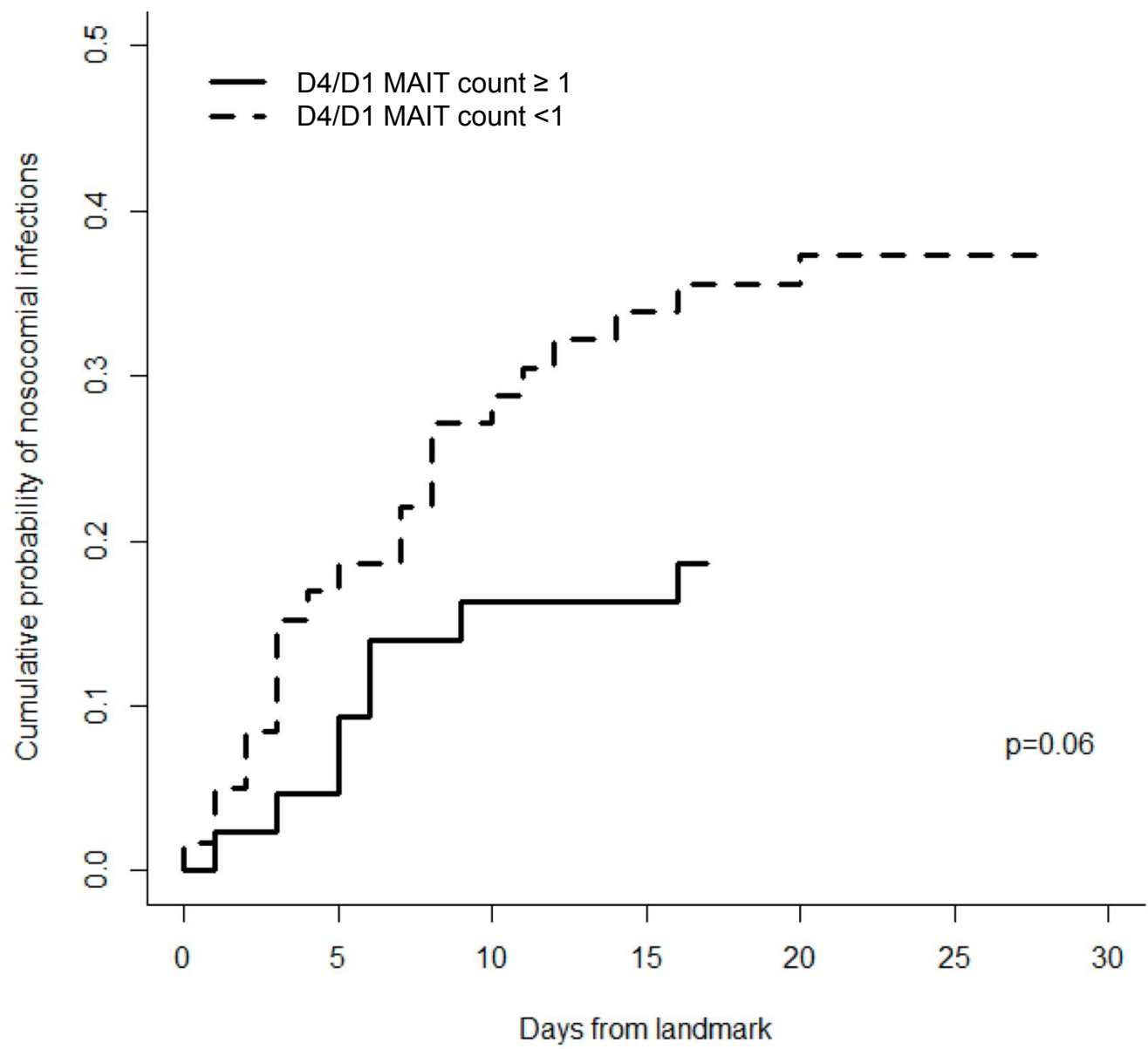


Fig. 3



Online supplementary material

Innate-like Mucosal-Associated Invariant T cells in critically ill patients with severe infections

David Grimaldi, Lionel Le Bourhis, Bertrand Sauneuf, Agnès Dechartres, Christophe Rousseau, Fatah Ouaz, Maud Milder, Delphine Louis, Jean-Daniel Chiche, Jean-Paul Mira, Olivier Lantz, Frédéric Pène

Supplemental methods

Patients and controls

All consecutive adult patients with severe sepsis/septic shock and patients with non-septic shock admitted to our tertiary medical ICU between June 2010 and March 2012 were eligible. According to consensus definitions, severe sepsis and septic shock were defined as presumed infection associated with at least two criteria of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the presence of organ failure [1] (critically ill infected patients). Critically ill infected patients with a definitive diagnosis of viral infection documented by PCR or serology in the absence of concomitant bacterial infection were enrolled into the study but were analysed separately. The other patients were classified as bacterial sepsis. Since *Streptococcus sp.* do not activate MAIT-cells in vitro, we *a priori* defined two groups of bacterial sepsis patients with or without streptococcal infections. Streptococcal sepsis was defined by microbiological identification of *Streptococcus sp.* or *Enterococcus sp.* as the only pathogen responsible for infection. *Streptococcus pneumoniae* could also be documented by a positive pneumococcal antigenuria in the context of pneumonia without recent anti-pneumococcal vaccination. Patients with shock related to non-infectious disorders were also enrolled into the study (critically ill non-infected patients). Cardiogenic shock was defined by the presence of

severe myocardial dysfunction (left ventricular ejection fraction lower than 30% as assessed by echocardiography) and the need for inotropic support by dobutamine ($>5 \mu\text{g/kg/min}$) or epinephrine at any dose in the absence of patent infection. Severe haemorrhage was defined as hypotension with acute blood loss requiring transfusion of at least four packed red cells within 24h.

Exclusion criteria were age < 18 y.o., pregnancy, presence of do-not-resuscitate orders on admission, hematologic malignancy, immunodeficiency defined as any stage of HIV infection, presence of bone marrow or solid organ transplantation, daily corticosteroid therapy $>0.5 \text{ mg/kg}$ prednisone-equivalent, chemotherapy or any other immunosuppressive treatments, resuscitated cardiac arrest and any infection requiring hospitalization within the last month prior to ICU admission. Two physicians (BS & FP), blinded from the individual results of flow cytometry, reviewed all patients' charts to ensure the inclusion criteria and the resulting group.

As innate-like lymphocytes counts and proportions counts may vary with age, we enrolled healthy volunteers and elderly subjects scheduled for elective cataract surgery to build a case-mix control cohort comparable to infected patients. Exclusion criteria from the control cohort were the following: history of inflammatory disease, corticosteroid treatment at any dose and infectious symptoms within the previous month.

Patients and healthy controls were included after personal or next of kin's informed consent. The study was approved by the institutional ethics committee (CPP Ile-de-France 3, decision number S.C. 2855).

Data collection

All clinical variables obtained during routine patient care were prospectively recorded using the patient data management system (Centricity Clinisoft[®], GE healthcare). We collected

demographic data, past medical history, severity scores on admission (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II (APACHE II) and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)) [2, 3]. Comorbidities were prospectively recorded based on patients' past history and included diabetes, cardiopathy (either ischemic, valvular, hypertrophic, dilated or rhythmic), chronic renal failure (baseline creatinine clearance < 30ml/min), chronic respiratory failure (documented obstructive or restrictive decrease of FEV1, long term oxygenotherapy), chronic liver disease (cirrhosis), chronic neurological conditions (hemiplegia, paraplegia, parkinson disease...) and solid cancer not treated by chemotherapy. ICU-acquired infections were defined as new-onset infections not present at the time of admission and developing until day 3 in the ICU, and were diagnosed according to the current guidelines [4, 5] and result of quantitative cultures when appropriate (respiratory samples and catheter culture). We considered the following parameters to distinguish between persistent infection and ICU-acquired infections: site of infection, microorganism(s) recovered and clinical course.

Innate-like lymphocyte analysis

Total circulating lymphocytes and innate-like T cells (MAIT, NKT and $\gamma\delta$ T-cells) were enumerated at day 1 (D1) following ICU admission, and then at D3-4 and D7-8 when available. Total lymphocyte count was determined by routine hemocytometer. Innate-like T-cells were quantified by a flow-cytometry based assay in the hours following blood drawing. Briefly, whole blood was sampled on a heparinized tube and was stained immediately with multiple fluorochrome-conjugated antibodies according to standard techniques. We used the following 7-color combination of antibodies: V α 7.2-FITC, TCR $\gamma\delta$ -PE (Beckman Coulter), CD8 β -PC5 (Beckman Coulter), CD4-APC-alexa750 (Invitrogen), CD161-APC (Miltenyi Biotec), CD3-Vioblue (Miltenyi Biotec), V α 24-PC7 (Beckman Coulter). After staining and red cells lysis (FACS lysis solution, BD Biosciences), leukocytes were washed 3 times (PBS

+ 0.04%BSA) and fixed. At least 10^5 lymphocytes were acquired on a multi-channel flow-cytometer Canto II[®] (BD Biosciences) and data were analysed using Diva[®] software (BD Biosciences). MAIT-cells were defined as $CD3^+ TCR\gamma\delta^- CD4^- CD161^{hi} V\alpha7.2^+$ cells⁶ [6]; $\gamma\delta$ lymphocytes were defined as $CD3^+ TCR\gamma\delta^+$ cells; NKT-cells were defined as $CD3^+ TCR\gamma\delta^- CD161^{hi} V\alpha24^+$ cells. We did not use live-dead staining. Doublets were excluded by the use of a narrowed lymphocyte gate. A representative example of gating strategy is given in the online supplementary material (Figure S1). Fluorescence Minus One (FMO) controls were checked for anti-CD161, V α 24 and V α 7.2 antibodies. The absolute number of innate-like lymphocytes was determined by multiplying the percentage from total lymphocytes and total lymphocyte count. Cell numbers were also expressed as relative counts, in order to take into account potential issues of hemodilution and lymphopenia. Thus, MAIT- and NKT-cells were expressed as percentage of $CD3^+ TCR\gamma\delta^-$ lymphocytes, and $\gamma\delta$ T-cells as percentage of total lymphocytes [6]. Physicians in charge of patients remained fully blinded to the results of flow cytometry.

Statistical analysis

Categorical data were presented as numbers (%) and continuous variables as median (interquartile range). Innate-like T-cells counts were represented as scatterplots with large lines and whiskers representing the median value and the 25th and 75th percentiles respectively. The percentage of innate-like cells was transformed using a log10 base to perform statistical analysis. Comparison of innate-like T-cells counts between patients' groups was done using ANOVA with Tukey post-hoc tests. Baseline factors potentially associated with day-1 MAIT-cell counts in patients were identified by univariate analysis. A general linear regression model including variables with a $p < 0.20$ in the univariate analysis was carried out to estimate the independent determinants of day-1 percentage of MAIT-cells.

A second model was built to estimate the respective impacts of non-streptococcal and streptococcal infections on day-1 MAIT-cell counts as compared to non-infected patients. Normality of residuals was systematically verified.

Finally, we estimated the cumulative incidence of ICU-acquired infections (IAI) over time taking into account the two other competitive events (discharge alive and death). We performed a landmark survival analysis [7] that allows taking into account a time-dependant variable. We *a priori* set time zero at four days after ICU admission. Using the Fine and gray method for competitive risks, we compared the cumulative probability of ICU-acquired infections from landmark (D4) between patients with and without decreased MAIT-cells over the four first days [8] . All tests were two-sided, and a P value <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed with R version 2.15.1 (R development core Team 2012).

Supplementary Table 1: Day 1 circulating innate-like lymphocytes values

	Severe bacterial infections			Severe viral infections	Controls	
	Overall N=113	Streptococcal N=37	Non- streptococcal N=76	N=7	Critically ill non- infected patients N=36	Healthy subjects N=26
Lymphocytes D1 (G/L)	0.60 (0.30-1.00)	0.55 (0.30-1.10)	0.69 (0.33-0.96)	1.00 (0.50-1.20)	1.00 (0.70-1.40)	1.60 (1.30-1.90)
MAIT/mm ³	1.30 (0.40-3.20)	1.47 (0.85-2.96)	1.22 (0.37-3.66)	8.20 (2.50-27.50)	4.30 (1.40-13.20)	31.10 (12.10-45.20)
% MAIT/CD3	0.47 (0.20-1.30)	0.72 (0.35-1.54)	0.41 (0.17-1.11)	1.56 (0.85-2.82)	0.78 (0.38-2.03)	2.59 (1.54-4.20)
Log %MAIT/CD3	-0.33 (-0.70 ; -0.11)	-0.14 (-0.46 ; -0.19)	-0.39 (-0.76 ; -0.04)	0.19 (-0.07 ; -0.45)	-0.10 (-0.42 ; -0.31)	0.41 (0.18-0.62)
% NKT/CD3	0.06 (0.02-0.11)	0.06 (0.02-0.11)	0.04 (0.02-0.11)	0.09 (0.08-0.11)	0.05 (0.03-0.09)	0.08 (0.04-0.11)
Log %NKT/CD3	-1.22 (-1.68 ; -0.93)	-1.16 (-1.32 ; -0.93)	-1.32 (-1.70 ; -0.96)	-1.03 (-1.08 ; -0.93)	-1.28 (-1.43 ; -1.04)	-1.12 (-1.40 ; -0.95)
% $\gamma\delta$ / T lymphocytes	1.10 (0.50-2.80)	1.25 (0.55-2.36)	0.94 (0.53-3.06)	0.60 (0.50-2.30)	1.20 (0.50-2.30)	3.00 (1.30-3.80)
Log % $\gamma\delta$ /T lymphocytes	0.04 (-0.27-0.45)	0.10 (-0.26-0.37)	-0.03 (-0.27-0.49)	-0.24 (-0.33-0.21)	0.09 (-0.33-0.36)	0.47 (0.13-0.58)

Continuous data are expressed as median (interquartile range)

Supplementary Table 2: Characteristics of the 32 patients with ICU-acquired infections

Female gender, n (%)	11 (34)
Age, (years)	65 (51-77)
APACHE II	29.5 (24.5-35)
Admission SOFA	13 (11-15)
Primary patients' group, n (%) :	
Severe bacterial infections	25 (78)
Severe viral infections	1 (3)
Critically ill non-infected	6 (19)
Time from ICU admission to first ICU-acquired infection, (days)	8 (6-11)
Mechanical ventilation, n (%)	31 (96.9)
In-ICU mortality, n (%)	12 (37.5)

Data are expressed as number (percentage) or median (interquartile range).

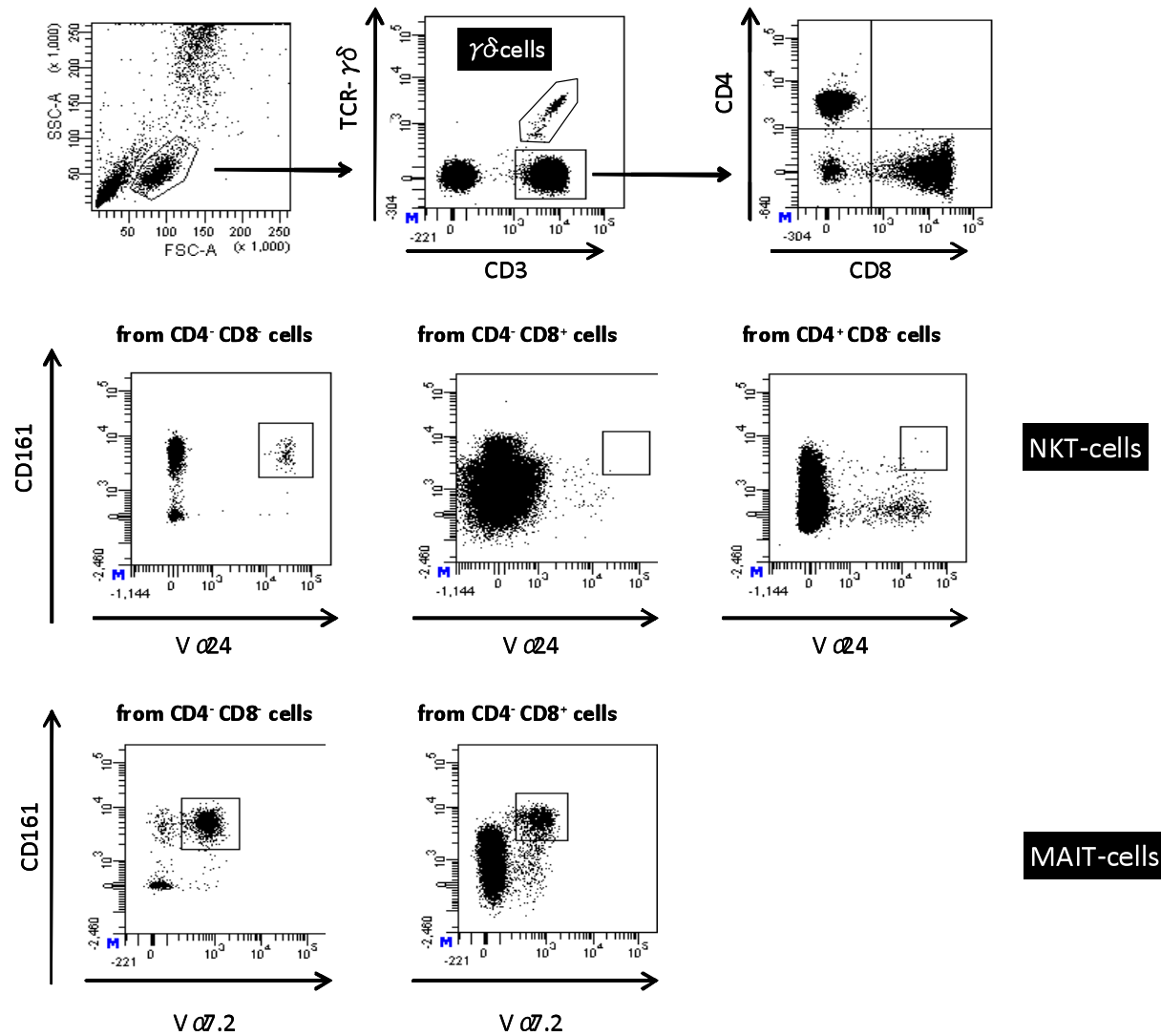
Abbreviations: APACHE II, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; ICU, intensive care unit.

Supplementary Table 3: Characteristics of the primary and the secondary infection in the 32 patients with ICU-acquired infections

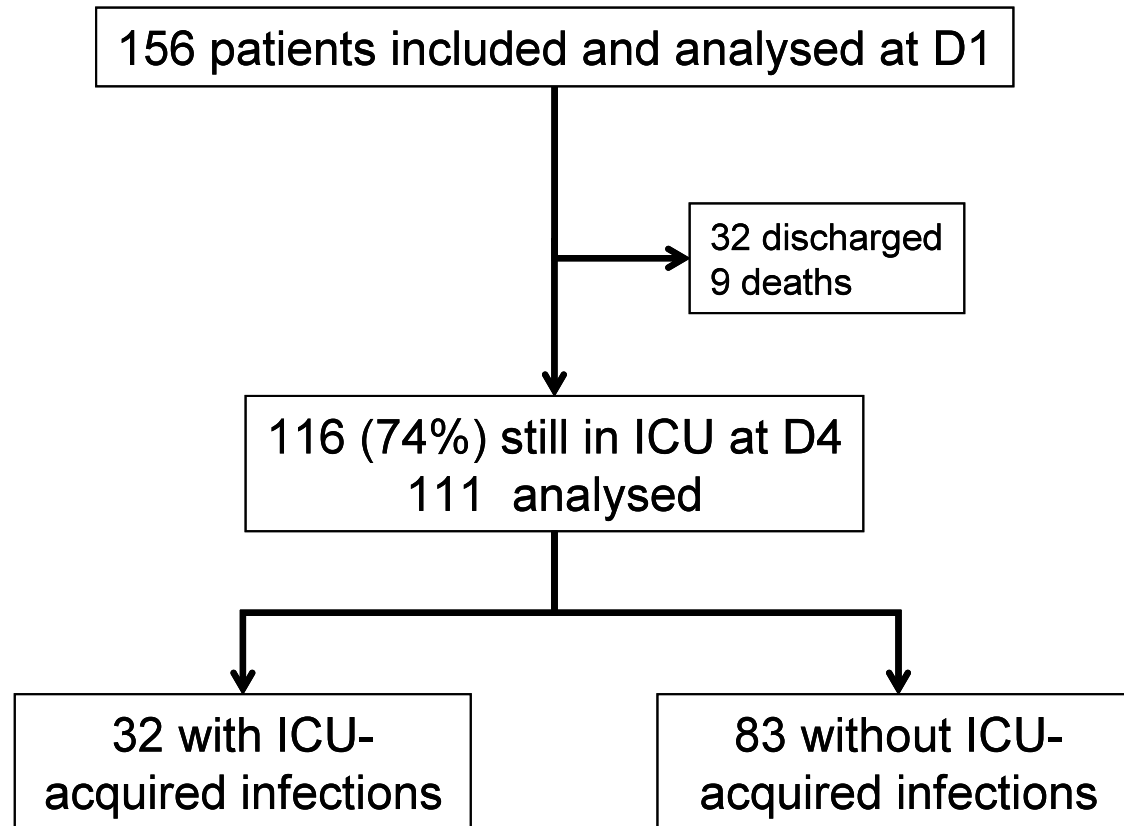
Patient number	Initial group	Primary infection site	Primary microorganism	Secondary infection site	Secondary microorganism
02	Severe sepsis	Abdominal	ND	Abdominal	Anaerobes
03	Severe sepsis	CAP	ND	VAP	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>
04	Severe sepsis	Abdominal	ND	Catheter	<i>P. aeruginosa</i> , <i>M. morganii</i>
14	Severe sepsis	Ascitic fluid infection	<i>S. galactiae</i>	VAP	<i>E. coli</i>
26	Viral infection	CAP	H1N1 <i>Influenzae</i>	VAP	<i>K. pneumoniae</i>
32	Severe sepsis	CAP	<i>S. pneumoniae</i>	Abdominal	ND
37	Severe sepsis	CAP	<i>S. pneumoniae</i>	VAP	<i>S. aureus</i>
38	Severe sepsis	CAP	<i>S. pneumoniae</i>	VAP	<i>E. cloacae</i>
39	Severe sepsis	CAP	<i>L. pneumophila</i>	VAP	<i>P. aeruginosa</i>
41	Severe sepsis	CAP	<i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Abdominal	<i>C. difficile</i>
43	Severe sepsis	Soft tissue	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. fecalis</i> , <i>E. cloacae</i>	Abdominal	ND
54	Non infected	na	na	Abdominal	<i>C. difficile</i>
57	Severe sepsis	Meningitis CAP	<i>S. pneumoniae</i>	VAP	<i>K. pneumoniae</i>
62	Severe sepsis	CAP	<i>S. pneumoniae</i>	VAP	<i>A. baumannii</i>
69	Severe sepsis	Mesenteric ischemia	ND	VAP	<i>E. cloacae</i>
71	Severe sepsis	Abdominal	<i>E. coli</i> , <i>E. fecalis</i> , Anaerobes	VAP	<i>A. baumannii</i>
76	Severe sepsis	HC-AP	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	VAP	<i>P. aeruginosa</i>
84	Non infected	na	na	Catheter	<i>E. cloacae</i>
85	Severe sepsis	Soft tissue	<i>E. fecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Abdominal	<i>C. difficile</i>
100	Severe sepsis	Urinary tract	<i>E. coli</i>	Catheter	<i>E. cloacae</i>
106	Severe sepsis	CAP	ND	VAP	<i>P. aeruginosa</i>
122	Severe sepsis	Urinary tract	<i>E. coli</i>	Ascitic fluid infection	Gram positive cocci
131	Non infected	CAP	<i>E. coli</i>	VAP	<i>S. marcescens</i>
132	Non infected	na	na	Bacteremia	<i>E. cloacae</i> , <i>E. fecalis</i>
139	Severe sepsis	Colitis	ND	VAP	<i>A. baumannii</i>

147	Severe sepsis	CAP	<i>S. pneumoniae</i>	VAP	<i>P. aeruginosa</i>
148	Non infected	na	na	VAP	<i>H. influenzae</i>
150	Severe sepsis	CAP	<i>H. influenzae</i>	Abdominal	ND
155	Non infected	na	na	VAP	<i>E. cloacae, H alvei</i>
158	Severe sepsis	Meningitis	<i>S. aureus</i>	Abdominal	<i>C. difficile</i>
161	Severe sepsis	CAP	ND	Bacteremia	<i>S. aureus</i>
162	Severe sepsis	CAP	<i>S. pneumoniae</i>	Abdominal	<i>E. coli, E. cloacae</i>

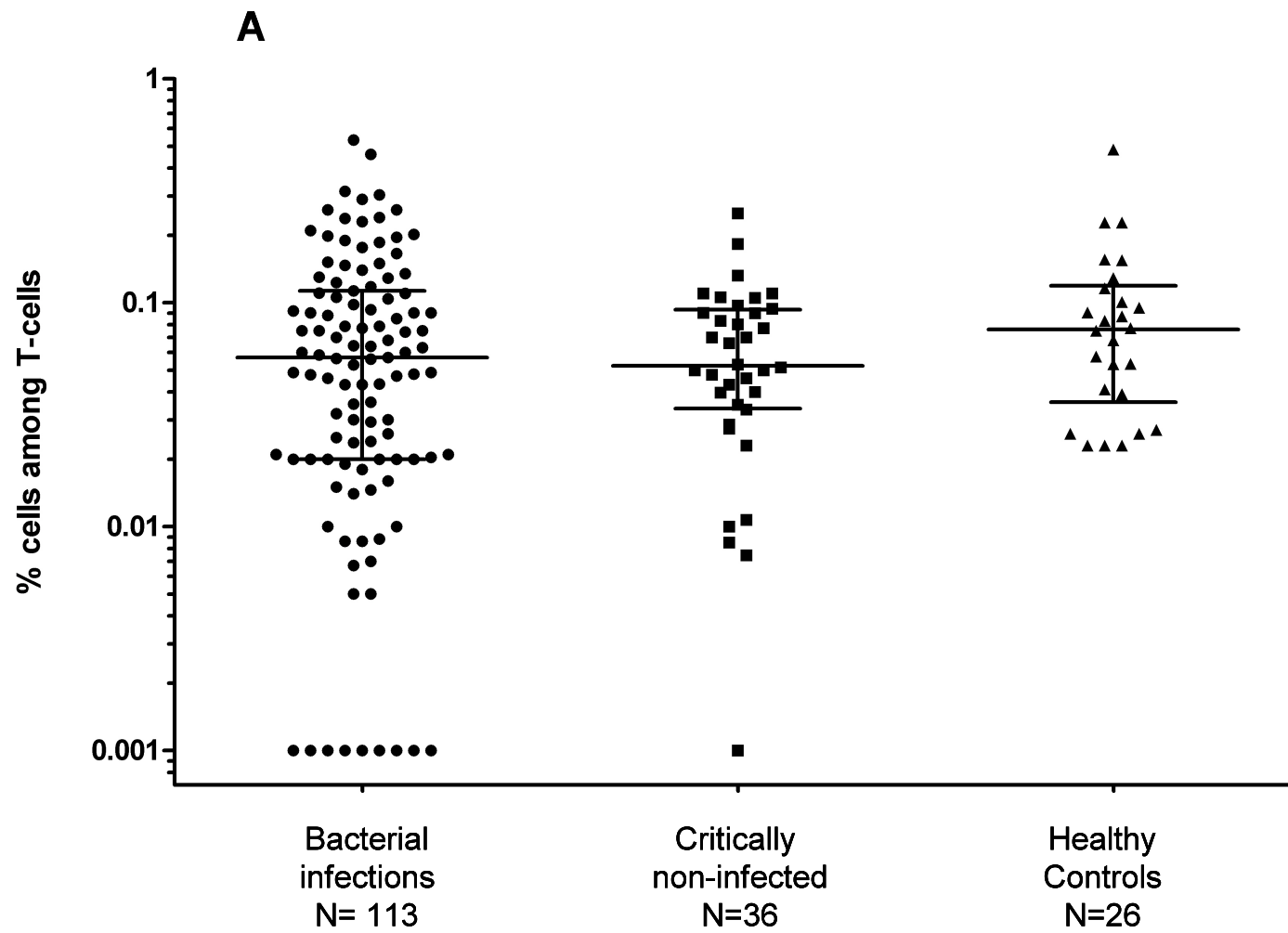
ND : Not Determined, na : not available

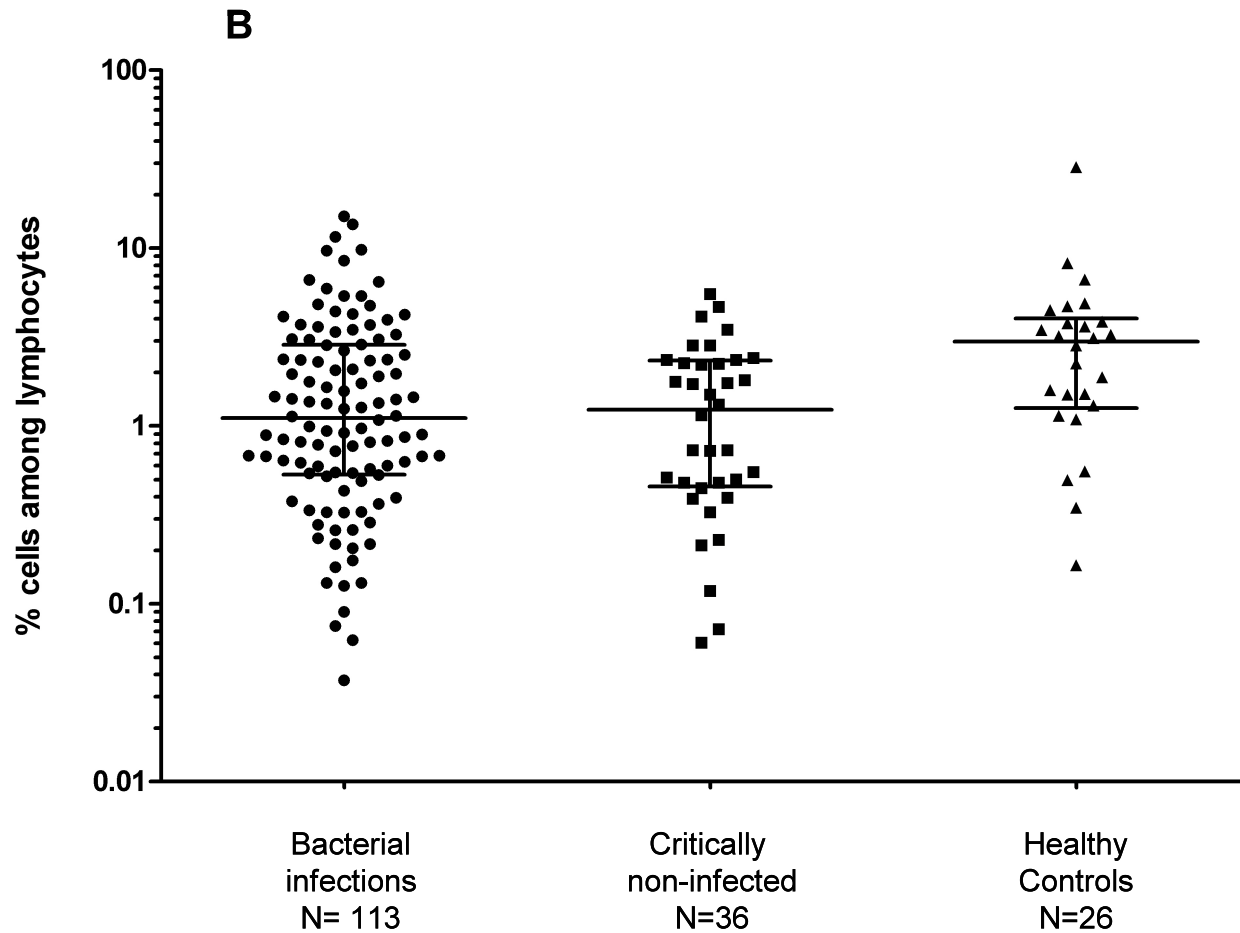


Supplementary figure 1: Representative gating strategy in a healthy control subject. Among total lymphocytes, $\gamma\delta$ lymphocytes were defined as CD3⁺ TCRγδ⁺ cells; MAIT-cells were defined as CD3⁺ TCRγδ⁻ CD4⁻ CD161^{hi} Vα7.2⁺ cells; NKT-cells were defined as CD3⁺ TCRγδ⁻ CD161^{hi} Vα24⁺ cells.



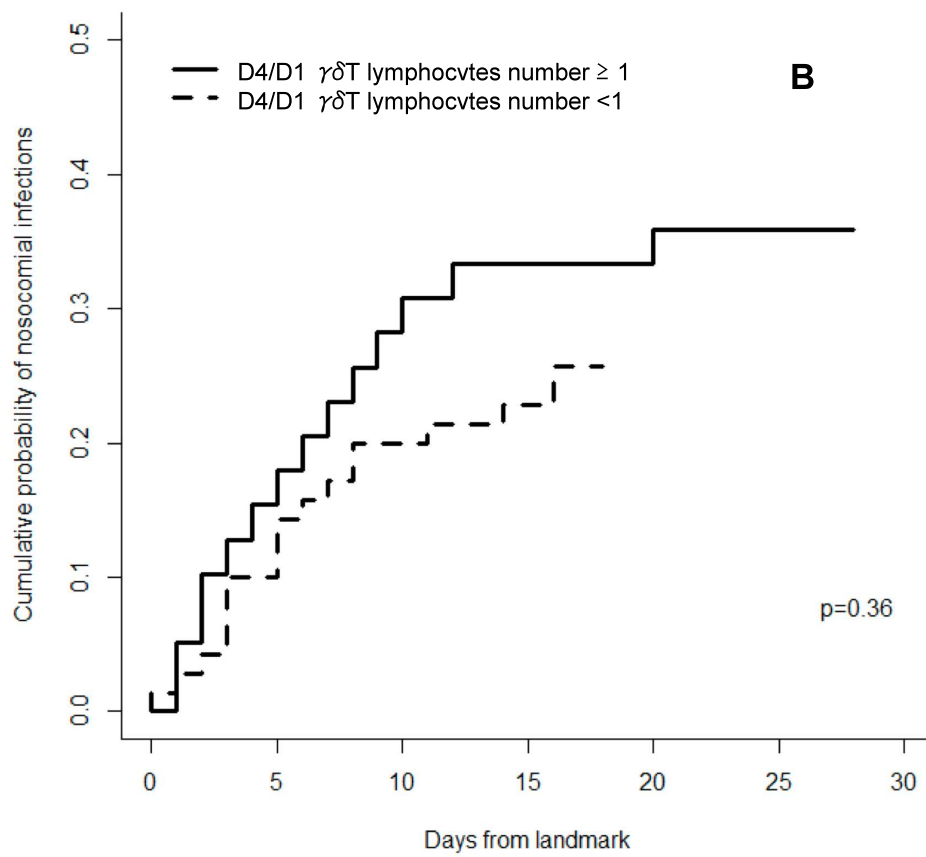
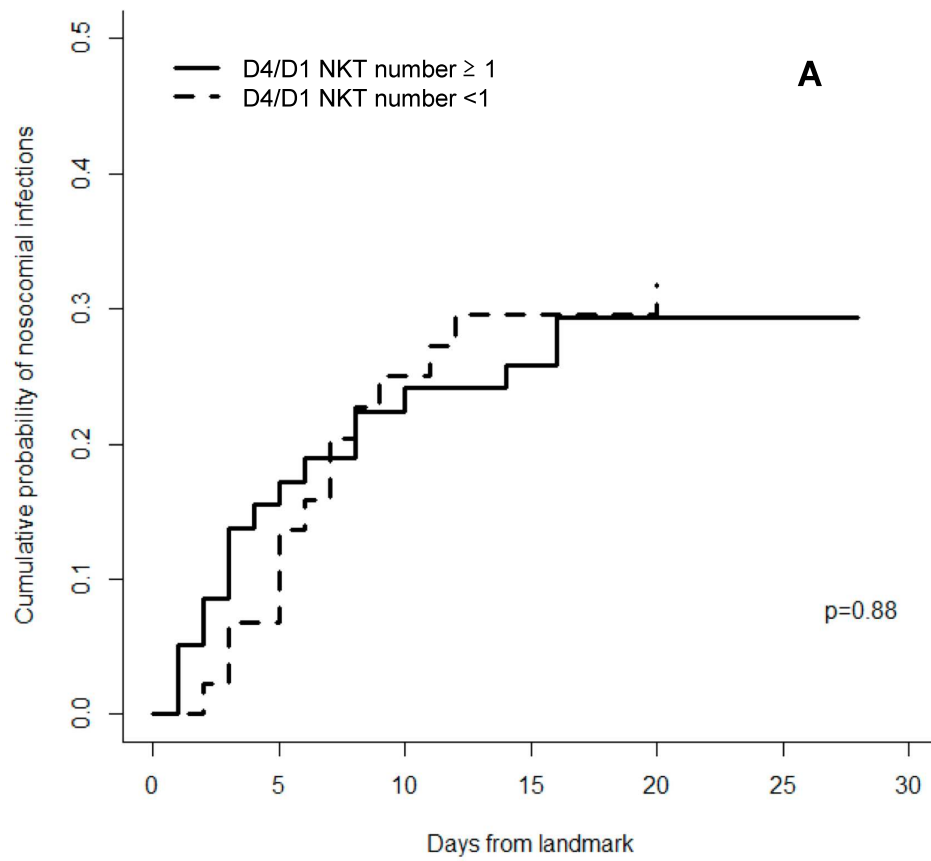
Supplementary figure 2: Flow chart of the study. Innate like-lymphocytes counts could not be analysed at day 4 in 5 patients (technical issue, n=1; samples not drawn, n=4)

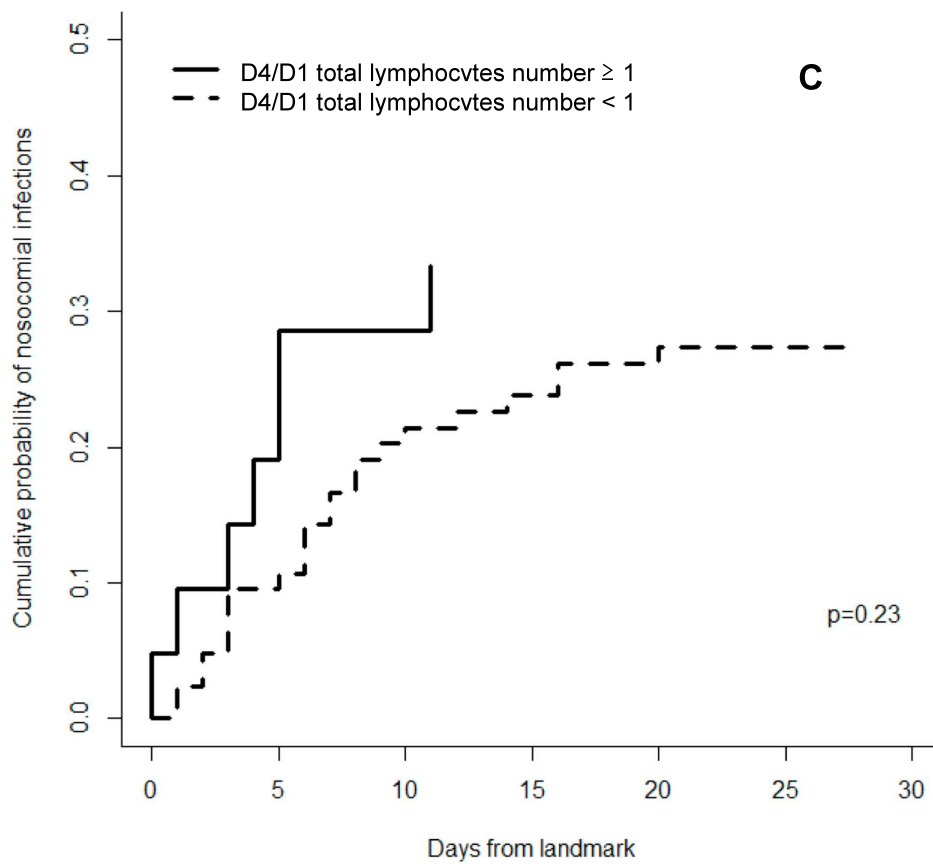




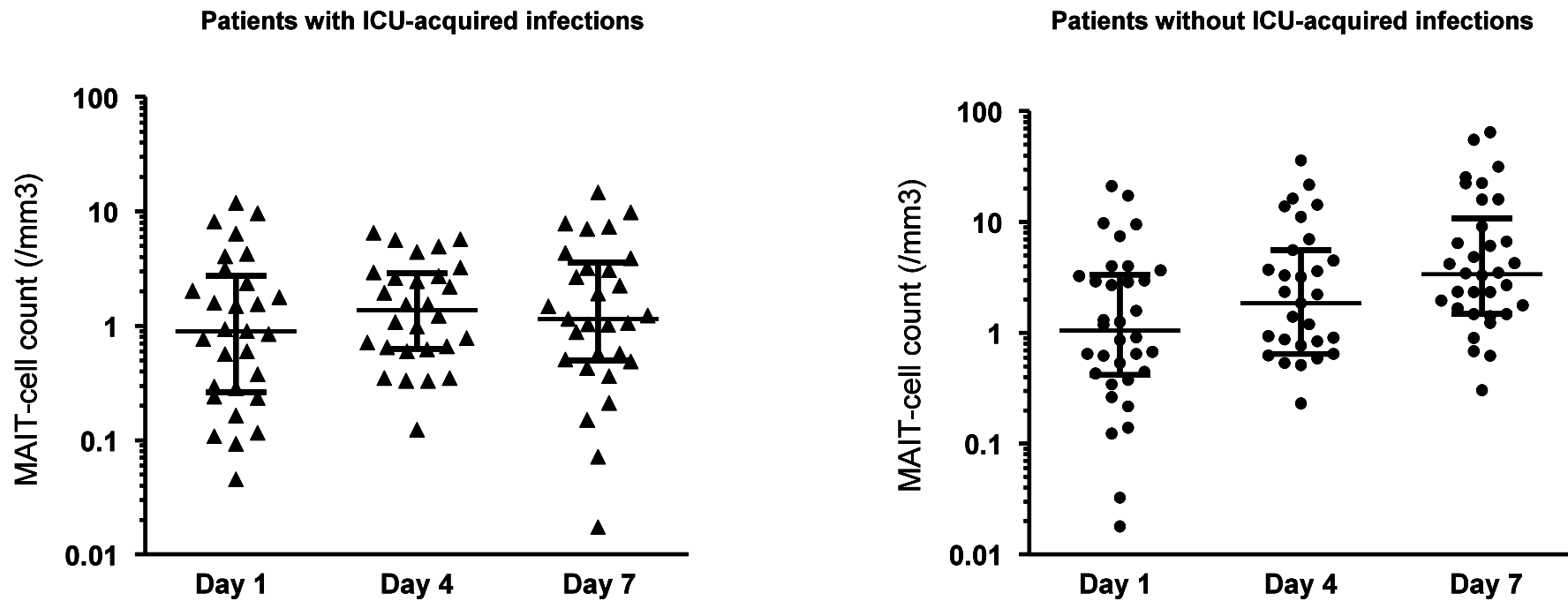
Supplementary figure 3: Circulating NKT- and $\gamma\delta$ T-cells counts in critically ill patients

NKT-cells proportions among conventional T-lymphocytes (A) and $\gamma\delta$ T-cells proportions among total lymphocytes (B) were quantified in critically ill infected and non-infected patients at day 1 and in healthy subjects. Results are displayed using a log10 scale. Line and whiskers represent the median value and the 25th and 75th percentiles respectively. Comparison between groups was made using ANOVA and post-hoc Tukey analysis after log10-based transformation of cell percentages.





Supplementary figure 4: Landmark survival analysis of cumulative incidence of ICU-acquired infection in the patients with increasing (continuous line) or decreasing (dashed line) NKT cells (A), $\gamma\delta$ cells (B) or total lymphocytes (C) between day 1 and 4. The time zero was *a priori* set at four days after ICU admission. Comparison was done using the Gray test for competitive risk analysis.



Supplementary figure 5: Evolution of MAIT-cell counts in patients who remained in the ICU at day 7 with, (triangles, n=29) or without, (dot, n=34) ICU-acquired infection. Results are displayed using a log10 scale.

Supplementary references:

1. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29: 530-538
2. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE, (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical care medicine* 13: 818-829
3. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG, (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22: 707-710
4. Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad, II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE, (2001) Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 32: 1249-1272
5. (2005) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171: 388-416
6. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Peguillet I, Premel V, Louis D, Milder M, Le Bourhis L, Soudais C, Treiner E, Lantz O, (2011) Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 117: 1250-1259
7. Anderson JR, Cain KC, Gelber RD, (1983) Analysis of survival by tumor response. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1: 710-719
8. Fine JP, Gray RJ, (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *Journal of the American Statistical Association* 94: 496-509

patients ne représentent pas les contrôles les plus appropriés de choc non infectieux pour être comparés aux patients septiques (cf supra).

- Nous avons nettement augmenté notre effectif de patients infectés (113 vs 43) car nous souhaitions pouvoir effectuer une analyse multivariée et faire des analyses de sous-groupes pertinents (streptocoque vs autres bactéries).

Les résultats de ces deux études humaines impliquent les DCs et des MAIT dans l'immunodépression post-infectieuse. Trois limites importantes communes à ces deux études doivent être soulignées : i) le mécanisme de diminution des cellules circulantes n'a pas pu être investigué. Les études expérimentales suggèrent que les cellules dendritiques présentent une apoptose massive au cours du choc septique alors qu'elles montrent que les MAIT migrent au sein du foyer infectieux; ii) L'étude fonctionnelle des différentes populations résiduelles n'était pratiquement pas possible car ces cellules étaient en nombre très faible voire virtuellement absentes chez certains patients ; iii) enfin, une association statistique entre le risque d'infection secondaire et la diminution des populations cellulaires ne permet pas la démonstration d'un lien de causalité malgré l'argument temporel entre la persistance de la déplétion et le diagnostic clinique de l'infection.

Ces limites justifient l'utilisation de modèles animaux expérimentaux pour investiguer les mécanismes de régulation de l'immunodépression post-infectieuse. Ils permettent de contrôler les conditions d'infection : infection primaire comparable, infection secondaire au même germe, ils autorisent naturellement l'étude en profondeur de la fonctionnalité des cellules du système immunitaire à n'importe quel moment de l'infection primaire ou secondaire et enfin, ils permettent de tester des hypothèses mécanistiques moléculaires ou cellulaires.

Chapitre 3:

L'absence du Toll-Like Récepteur 2
protège les souris post-septiques
d'une pneumonie secondaire à *Pseudomonas aeruginosa*

Toll-like receptor 2 deficiency increases resistance to Pseudomonas aeruginosa pneumonia in the setting of sepsis-induced immune dysfunction

F Pène*, D Grimaldi*, B Zuber, B Sauneuf, C Rousseau, C El Hachem, C Martin, N Belaïdouni, V Balloy, JP Mira, JD Chiche

J Infect Dis. 2012 Sep 15;206(6):932-42

* co-premiers auteurs

Lors d'une infection par un pathogène, la signalisation dépendante des TLRs est à l'origine de la réaction inflammatoire caractéristique de la réponse immunitaire innée et est également impliquée dans l'organisation de la réponse immunitaire adaptative. En revanche, le rôle de la signalisation dépendante des TLRs dans le développement d'une immunodépression post-infectieuse a été peu investigué. Des données récentes suggèrent que les TLRs pourraient être impliqués dans ces phénomènes. Ils participent à l'induction de l'apoptose des cellules dendritiques induite par le sepsis polymicrobien (115, 119) et certaines molécules inhibitrices de la voie de signalisation dépendant de TLR4, semblent impliquées dans la susceptibilité à une infection secondaire (313, 320).

L'objectif de ce travail était d'investiguer le rôle de 3 TLRs majeurs impliqués dans la reconnaissance de *Pseudomonas aeruginosa* : TLR2, TLR4 et TLR5. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de double agression infectieuse séquentielle développé au laboratoire, dans lequel les souris sont soumises à une péritonite polymicrobienne sublétales, puis soumises à une instillation intra-trachéale de *P. aeruginosa* à 8 jours de la chirurgie. Ce modèle, qui mime la situation clinique fréquente d'une péritonite par perforation d'organe suivie d'une pneumonie nosocomiale à *P. aeruginosa*, avait permis de confirmer la susceptibilité des animaux post-septiques au challenge infectieux secondaire. Nous avons appliqué ce modèle à des souris déficientes pour TLR2, TLR4, TLR2x4 et TLR5.

Les principaux résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

- La LPC induisait spécifiquement dès J1 et au moins jusqu'à J8 une augmentation de la transcription de TLR2 au niveau pulmonaire des animaux WT alors que la transcription des récepteurs TLR4 et TLR5 n'était pas modifiée (figure 2A).
- Alors que les souris *tlr4*^{-/-} et *tlr5*^{-/-} en phase post-septique étaient hypersusceptibles à une pneumonie secondaire à *P. aeruginosa* de manière comparable avec les souris wt, les

souris déficientes pour TLR2, *tlr2*^{-/-} ou *tlr2x4*^{-/-}) sont apparues particulièrement résistantes (Figure 1).

- Après instillation intratrachéale de *P. aeruginosa*, la clairance bactérienne pulmonaire des animaux *tlr2*^{-/-} était accélérée et la dissémination systémique de l'infection moindre par rapport aux animaux wt (figure 3).
- L'augmentation de la clairance bactérienne des animaux *tlr2*^{-/-} n'était pas liée à un afflux plus important de PNN (figure 2A). Par ailleurs, l'activité myéloperoxydase (MPO) mesurée dans le LBA, reflet de la capacité à produire des radicaux libres de l'oxygène, était également inférieure chez les animaux mutés par rapport aux animaux wt. Enfin, les capacités de phagocytose et de bactéricidie des macrophages et des PNN étaient comparables entre animaux wt et *tlr2*^{-/-} (figure 5).
- Le phénotype des souris *tlr2*^{-/-} était en revanche associé à une orientation pro-inflammatoire de la balance pulmonaire cytokinique, avec notamment une augmentation de la production de TNF- α et une diminution de la production d'IL-10 (Figure 7). En d'autres termes, le maintien d'une réponse pro-inflammatoire pulmonaire et en particulier la sécrétion de TNF- α semblait bénéfique pour une réponse anti-infectieuse adaptée en phase post-septique.

Cette étude ouvre des perspectives dans la compréhension physiopathologique, la prévention et le traitement des pneumonies nosocomiales :

- La résistance des souris déficientes pour TLR2 à l'infection secondaire à *P. aeruginosa* était un résultat inattendu, d'autant que ces souris ont un taux de survie comparable en réponse au sepsis polymicrobien initial. De plus, bien que TLR2 contribue à la réponse cellulaire à *P. aeruginosa*, ce récepteur avait jusqu'alors été considéré comme accessoire dans la réponse anti-infectieuse de l'hôte lors d'une pneumonie primaire à ce germe (326). En effet, dans des modèles d'infection pulmonaire primaire à *P. aeruginosa*, la protéine

adaptatrice MyD88 joue un rôle crucial dans la réponse anti-pyocyanique, et la reconnaissance de la bactérie dépend essentiellement de TLR4 et TLR5 (110-113, 327).

- Au-delà des différences de réponse pulmonaire anti-infectieuse entre souris wt et *tlr2*^{-/-}, les mécanismes responsables du rôle délétère de TLR2 n'ont pas été identifiés mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées : implication de TLR2 dans la prolifération de lymphocytes T régulateurs, augmentation de la sécrétion d'IL-10, rôle sur les propriétés biologiques des PNN, action spécifique sur l'épithélium pulmonaire... A ce jour aucune de ces hypothèses n'a néanmoins pu être confirmée. Le rôle de TLR2 pourrait être précisé en réalisant des souris chimériques par greffe de moelle, permettant de préciser le rôle de l'expression différentielle de TLR2 sur les cellules d'origine hématopoïétiques et sur les cellules épithéliales. Chez l'homme, l'impact de polymorphismes fonctionnels de *TLR2* sur le risque de survenue de pneumonies nosocomiales mériterait d'être étudié pour confirmer nos résultats.

Toll-Like Receptor 2 Deficiency Increases Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in the Setting of Sepsis-Induced Immune Dysfunction

Frédéric Pène,^{1,2,3,4,a} David Grimaldi,^{1,2,3,4,a} Benjamin Zuber,^{1,2,3,4} Bertrand Sauneuf,^{1,2,3,4} Christophe Rousseau,^{1,2,3} Carole El Hachem,^{1,2,3} Clémence Martin,^{3,5} Nadia Belaïdouni,^{1,2,3} Viviane Balloy,^{6,7} Jean-Paul Mira,^{1,2,3,4} and Jean-Daniel Chiche^{1,2,3,4}

¹Inserm U1016, Institut Cochin; ²CNRS UMR-8104; ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité; ⁴Réanimation Médicale, Hôpital Cochin, AP-HP, UPRES EA 2511; ⁵Unité de Défense Innée et Inflammation, Institut Pasteur; and ⁷Inserm U874, Paris, France

Background. Sepsis is characterized by a dysregulated inflammatory response followed by immunosuppression that favors the development of secondary infections. Toll-like receptors (TLRs) are major regulators of the host's response to infections. How variability in TLR signaling may impact the development of sepsis-induced immune dysfunction has not been established. We sought to establish the role of TLR2, TLR4, and TLR5 in post-septic mice with *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.

Methods. We used an experimental model of sublethal polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). Wild-type, *tlr2*^{-/-}, *tlr4*^{-/-}, *tlr5*^{-/-}, *tlr2* × *4*^{-/-} mice that underwent CLP were secondarily subjected to *P. aeruginosa* pulmonary infection.

Results. Postseptic wild-type and *tlr4*^{-/-} and *tlr5*^{-/-} mice displayed high susceptibility to *P. aeruginosa* pneumonia. In contrast, TLR2-deficient mice, either *tlr2*^{-/-} or *tlr2* × *4*^{-/-}, that underwent CLP were resistant to the secondary pulmonary infection. As compared to wild-type mice, *tlr2*^{-/-} mice displayed improvement in bacterial clearance, decreased bacteremic dissemination, and attenuated lung damage. Furthermore, *tlr2*^{-/-} mice exhibited a pulmonary proinflammatory cytokine balance, with increased production of tumor necrosis factor α and decreased release of interleukin 10.

Conclusions. In a model of secondary *P. aeruginosa* pneumonia in postseptic mice, TLR2 deficiency improves survival by promoting efficient bacterial clearance and restoring a proinflammatory cytokine balance in the lung.

Sepsis is a common life-threatening inflammatory response to infection, affecting nearly 700 000 patients annually in the United States and contributing

to 20% of all in-hospital deaths [1]. Of interest, the vast majority of patients with severe sepsis and septic shock survive the primary infection but tend to develop intensive care unit (ICU)-acquired infections [2, 3]. Thus, ventilator-associated pneumonia often complicates the course of 10%–30% of ICU patients mechanically ventilated for septic shock and considerably increases morbidity and mortality [4]. In addition to classical risk factors of ICU-acquired pneumonia [4], sepsis-induced immunosuppression may alter the mechanisms of pulmonary response to a second infectious insult and may contribute to the increased susceptibility of septic patients to nosocomial pneumonia [5].

Sepsis-induced immunosuppression is characterized by innate and adaptive immune defects, including a

Received 26 September 2011; accepted 19 March 2012; electronically published 10 July 2012.

^aF. P. and D. G. contributed equally to this work.

Presented in part: 38th Congress of the Société de Réanimation de Langue Française (abstract SP135), Paris, France, 20–22 January 2010; and 23rd Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine (abstract 0453), Barcelona, Spain, 9–13 October 2010.

Correspondence: Jean-Daniel Chiche, MD, PhD, Réanimation Médicale, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France (jean-daniel.chiche@cch.aphp.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2012;206:932–42

© The Author 2012. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jis438

shift toward an anti-inflammatory cytokine pattern [6–8]; deactivation of monocytes, as evidenced by reduced expression of HLA-DR [9–11]; apoptosis of T and B lymphocytes [12, 13], with a relative increase of regulatory T cells [14]; and quantitative and functional defects of dendritic cells [15–17]. Several studies have linked sepsis-induced immunosuppression to the advent of secondary infections. Thus, decreased monocyte HLA-DR expression has been associated with secondary infections after septic shock, trauma, or burn injury [3, 18, 19]. In addition, persistent depletion in myeloid dendritic cells is associated with an increased risk of nosocomial infection following human septic shock [17]. Accordingly, several experimental models have linked sepsis-induced immune dysfunction and increased susceptibility to pneumonia [15, 20–22].

The molecular mechanisms that underlie alterations of host defense of the lung following septic shock remain poorly understood. Several lines of evidence indicate that Toll-like receptors (TLRs) play an important role against pathogens commonly encountered in nosocomial pneumonia. Thus, several studies support distinct and complementary roles for TLR2, TLR4, and TLR5 in the recognition of *P. aeruginosa* in the lungs [23–27]. Activated TLRs also contribute to lung immunity through interactions with the immunomodulatory surfactant protein SP-A [28]. Because variability in the activation of TLR signaling pathways influences the magnitude of the proinflammatory response toward a primary infection, it may also impact the advent of sepsis-induced immune dysfunction. Indeed, TLR-dependent signaling influences immune cell homeostasis during sepsis. Absence of the adaptor protein MyD88 attenuates sepsis-induced lymphocyte apoptosis and the subsequent expansion of myeloid derived suppressor cells [29, 30]. In addition, apoptosis of spleen dendritic cells is prevented in TLR2- and TLR4-deficient mice subjected to polymicrobial sepsis [31]. Because the contribution of specific TLRs to the development of sepsis-induced immune dysfunction remains incompletely understood, we investigated whether TLR-dependent signaling modulates the postseptic host's response to secondary infections. Specifically, we assessed the respective contributions of TLR2, TLR4, and TLR5 to lung defense in a clinically relevant model of *Pseudomonas aeruginosa* secondary pneumonia in wild-type (WT) and gene-deficient mice previously subjected to sublethal polymicrobial sepsis.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female C57BL/6J mice aged 8–12 weeks were used in all experiments. Wild-type mice were purchased from Charles River Laboratories. *tlr2*^{−/−}, *tlr4*^{−/−}, and *tlr5*^{−/−} mice were obtained from S. Akira (Osaka University, Osaka, Japan) and were backcrossed 8 times with C57BL/6J mice. Double-knockout

tlr2 × *tlr4*^{−/−} mice were generated by breeding *tlr2*^{−/−} and *tlr4*^{−/−} mice. All animals were maintained in the pathogen-free animal facility of the Cochin Institute. Experiments were conducted in accordance with Cochin Institute guidelines, in compliance with European animal welfare regulations.

Model of Polymicrobial Sepsis

We used a sublethal model of cecal ligation and puncture (CLP) followed by a short course of antibiotics, as previously described [15]. In brief, the cecum was exposed, ligatured at its external third, and punctured through and through with a 21-gauge needle. The incision was sutured in layers, and animals were resuscitated with an intraperitoneal injection of 1 mL of saline. Six hours following surgery and then every 12 hours during the next 3 days, mice received an intraperitoneal injection of antibiotics (imipenem cilastatin 25 mg/kg in 0.5 mL saline).

Induction of Secondary Pneumonia

To create a relevant model of secondary pneumonia, survivors on day 8 were subjected to intratracheal instillation of *P. aeruginosa* strain PAO1 [15]. In brief, *P. aeruginosa* was incubated for 12 hours in tryptic soy broth at 37°C in a rotating shaker. The desired bacterial concentration was adjusted by spectrophotometry according to a reference curve and was systematically verified by quantitative culture of the inoculum. For intratracheal instillation of mice, brief anesthesia was induced by isoflurane inhalation, and a cannula was inserted into the trachea. The intratracheal position of the cannula was verified by respiratory oscillations of a droplet inside a 1-mL syringe. The desired quantity of bacteria was instilled in a volume of 50 μ L.

Bronchoalveolar Lavage (BAL)

Mice were euthanized and subjected to BAL with 2 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS). The BAL fluid was immediately processed for bacterial quantification and enumeration of cells, with the percentage of neutrophils estimated on hematoxylin-eosin-stained cytospin slides. BAL supernatant was stored at −80°C. The protein level in BAL fluid was quantified using an enzymatic assay (BCA protein assay, Pierce). To determine myeloperoxidase (MPO) activity, BAL fluid was incubated with *o*-dianisidine dihydrochloride in Hank's medium supplemented with 0.004% H₂O₂. The reaction was stopped by adding 1% NaN₃, and MPO activity was determined by spectrophotometry (absorbance at 450 nm). Concentrations of CXCL1, CXCL2, tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 10 (IL-10), interferon γ (IFN- γ), and interleukin 17 (IL-17) were quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Assessment of Bacteremic Dissemination

Bacteremic dissemination of *P. aeruginosa* was assessed through quantitative bacterial cultures of spleen homogenates in tryptic soy agar supplemented with 100 mg/L amoxicillin-clavulanic acid, to avoid growth of nonpseudomonas bacteria. As a feature of *P. aeruginosa*, oxidase activity was checked in bacterial colonies.

Lung Cell Distribution

Lungs were perfused with 1 mL of collagenase/dispase (1 mg/mL) and DNase I (0.5 mg/mL) (Roche) and incubated at room temperature for 45 minutes on a rotating shaker. Digested lungs were then smashed and passed through a 40- μ m cell strainer. Erythrocytes were lysed with red blood cell lysis buffer. Cell distribution was assessed by multiple-staining flow cytometry analysis, using fluorescent anti-CD11b (Miltenyi), anti-NK1.1, anti-Ly6C, anti-Ly6G, anti-F4/80 (Becton Dickinson), and anti-CD11c (Invitrogen) antibodies. Neutrophils were identified as CD11b⁺ Ly6G^{high}, proinflammatory monocytes as CD11b⁺ Ly6C^{high} Ly6G⁻ F4/80^{intermediate}, anti-inflammatory monocytes as CD11b⁺ Ly6C^{low} Ly6G⁻ F4/80^{intermediate}, alveolar macrophages as CD11b⁺ F4/80^{high}, and dendritic cells as CD11c^{high} F4/80⁻.

Histological Analysis

Whole lungs were successively fixed in 4% paraformaldehyde for 36 hours, dehydrated in successive baths with increasing ethanol concentration (30%, 50%, and 70%), embedded in paraffin, and cut into 5- μ m sections. The sections were stained with hematoxylin-eosin for tissue examination. Quantitative morphometric analysis was performed on photographs, magnified 8-fold, of 3 distant sections. The surface of lung tissue with neutrophil infiltration or consolidation was quantified by a blinded pulmonologist investigator by use of intersection counting and was expressed as a proportion of the total lung surface.

Phagocytosis and Bacterial Killing Assays

Neutrophils were purified from the bone marrow, using an immunomagnetic-negative selection (Stemcell Technologies, Grenoble, France). A total of 10^6 cells were incubated at 37°C for 30 minutes with *P. aeruginosa* at a multiplicity of infection (MOI) of 1:100 in antibiotic-free medium. Cells were then washed in PBS and resuspended for 30 minutes in medium containing 100 μ g/mL tobramycin to remove extracellular bacteria. Cells were lysed in PBS containing 0.1% Triton 100 for assessment of phagocytosis ($t=0$), and additional samples were incubated for 1 additional hour ($t=1$ hour) to assess bacterial killing.

Alveolar macrophages were collected by BAL, and samples from 4–6 mice were pooled. Cells were seeded at 10^5 cells/well onto flat-bottomed 96-well plates in Roswell Park Memorial

Institute 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. Plates were cultured overnight to separate plastic-adherent cells, and nonadherent cells were removed by replacement of culture medium with antibiotic-free medium. Adherent alveolar macrophages were infected with *P. aeruginosa* at an MOI ratio of 1:10. Plates were centrifuged (500 g for 10 minutes) to initiate contact between cells and bacteria and were incubated at 37°C for 1 hour. After removal of extracellular bacteria by tobramycin, cells were lysed with reporter lysis buffer (Promega) for assessment of phagocytosis ($t=0$) and bacterial killing ($t=2$ hours).

In both experiments, the number of intracellular bacteria was determined from lysates plated overnight onto agar plates at 37°C. Killing was calculated from the percentage of colonies present at $t=1$ hour or $t=2$ hours, compared with $t=0$ hours, as follows: $100 - [\text{number of colony-forming units (CFU)}_{t=1 \text{ hour or } 2 \text{ hours}} / \text{number of CFU}_{t=0 \text{ hours}}]$.

RNA Isolation and Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

Lungs were frozen and ground on dry ice, and powder tissue was used for RNA isolation. RNA extraction was performed with 100 mg of powder tissue, using the PureLink RNA kit (Invitrogen). RNA cleanup/DNase digestion was performed using the RNeasy mini kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. Complementary DNA was synthesized using the RevertAid H-Minus M-MuLV protocol (Fermentas). Expressions of the genes of interest (*tlr2*, *tlr4*, *tlr5*, *il10*, *tnfa*, *ifn γ* , and *il17*) and of the reference gene *hprt* were quantified in duplicates by real-time PCR. Gene expression was expressed as $2^{-\Delta\text{Ct}}$, where ΔCt is defined as the change in cycle threshold, calculated as $\text{Ct}_{\text{target}} - \text{Ct}_{\text{hprt}}$ for each individual sample.

Statistical Analysis

Survival curves were analyzed using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. Continuous variables were expressed as mean \pm SD and were compared using the Mann-Whitney *U* test. *P* values $< .05$ indicated statistically significant differences.

RESULTS

Influence of TLR2, TLR4, and TLR5 on the Outcome of Secondary *P. aeruginosa* Pneumonia

To investigate the role of TLR-dependent signaling pathways in host defense against secondary *P. aeruginosa* pneumonia, WT, *tlr2*^{-/-}, *tlr4*^{-/-}, *tlr2* \times *tlr4*^{-/-}, and *tlr5*^{-/-} mice were subjected to a sequential double-hit model through sublethal polymicrobial sepsis induced by CLP, followed by late-onset (on day 8 after CLP) *P. aeruginosa* pneumonia. We first established that these different mouse strains had survival rates $>50\%$

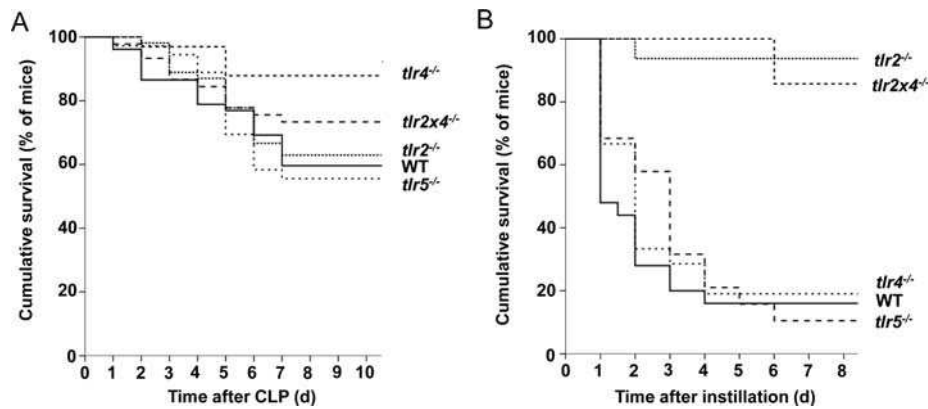


Figure 1. Postseptic *tlr2*^{-/-} mice are resistant to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **A**, Wild-type (WT), *tlr2*^{-/-}, *tlr4*^{-/-}, *tlr2* × *4*^{-/-}, and *tlr5*^{-/-} mice were subjected to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) with a 21-gauge needle and then received a 3-day course of broad-spectrum antibiotics. Survival was monitored twice daily. *P* < .05 between *tlr4*^{-/-} and WT mice (*n* = 15–20 animals per group). **B**, Mice that underwent CLP and survived polymicrobial sepsis were subjected to a secondary pulmonary infection induced by intratracheal instillation of 5 × 10⁶ colony-forming units (CFUs) of *P. aeruginosa* on day 8 after surgery. Survival was monitored twice daily for 10 days. *P* < .05 between *tlr2*^{-/-} and WT mice and between *tlr2* × *4*^{-/-} and WT mice (*n* = 15–20 animals per group).

following CLP (Figure 1A). Survivors on day 8 after CLP were then subjected to intratracheal instillation of a bacterial load of *P. aeruginosa* (5 × 10⁶ CFUs) that is known to be innocuous in WT mice that underwent sham surgery [15]. Postseptic WT mice displayed high susceptibility to secondary pneumonia (mortality rate, 80%) (Figure 1B). With a 75% mortality rate, postseptic *tlr4*^{-/-} and *tlr5*^{-/-} mice fared similarly to WT mice. In contrast, TLR2-deficient mice (either *tlr2*^{-/-} or *tlr2* × *4*^{-/-}) displayed resistance to secondary pulmonary infection, with respective survival rates of 90% (for *tlr2*^{-/-} mice) and 85% (for *tlr2* × *4*^{-/-} mice) (Figure 1B). These data suggest that the absence of TLR2 improves host defense in this model.

Polymicrobial Sepsis Upregulates TLR2 Pulmonary Expression

Host defense mechanisms against *P. aeruginosa* involve TLR2, TLR4, and TLR5. To assess whether polymicrobial sepsis alters expression of TLRs in the lung, we measured expression of *tlr2*, *tlr4*, and *tlr5* messenger RNA (mRNA) in lung homogenates obtained from WT mice early (on day 1) or later (on day 8) after CLP. As compared to control animals, *tlr2* lung expression displayed a sustained increase in CLP-operated mice (Figure 2A). In contrast, gene expressions of *tlr4* and *tlr5* were not significantly impacted by polymicrobial sepsis. This result points to a specific contribution of TLR2 to lung defense in postseptic hosts.

WT and *tlr2*^{-/-} Postseptic Mice Exhibit Minimal Lung Inflammation

Different baseline lung inflammatory status at the time of pulmonary challenge may alter the response to *P. aeruginosa* in postseptic mice. Prior to any bacterial intratracheal instillation, the protein levels (Figure 2B) and cell counts (Figure 2C) in

BAL fluids were very low in WT and *tlr2*^{-/-} animals on day 8 after CLP, suggesting low baseline pulmonary inflammation. The distribution of innate cells such as neutrophils, proinflammatory monocytes, alveolar macrophages, and dendritic cells throughout the lung was similar in WT and *tlr2*^{-/-} mice. Only the proportion of anti-inflammatory monocytes was decreased in *tlr2*^{-/-} mice as compared to WT counterparts (Figure 2D). These results suggest that postseptic mice exhibit minimal lung inflammation that is unlikely to explain the different outcomes of WT and *tlr2*^{-/-} mice to *P. aeruginosa* pneumonia.

TLR2 Deficiency Improves Bacterial Clearance in Postseptic Mice

To understand how TLR2 deficiency confers protection against secondary *P. aeruginosa* pneumonia, we compared the host defense mechanisms of WT and *tlr2*^{-/-} mice. First, we assessed lung clearance of *P. aeruginosa* through quantitative bacterial cultures of BAL fluids collected 24 hours after intratracheal instillation. With a grossly 100-fold decrease in bacterial concentration in BAL fluid, bacterial clearance was significantly improved in *tlr2*^{-/-} mice as compared to WT animals (Figure 3A). *tlr2*^{-/-} mice also displayed a marked decrease in bacteremia, as assessed by cultures of spleen homogenates (Figure 3B). These data suggest that TLR2 impairs lung bacterial clearance and might impede systemic clearance or compartmentalization of infection in secondary pneumonia.

TLR2 Modulates Lung Recruitment and Activation of Neutrophils in Postseptic Mice

Recruitment of phagocytic cells, especially neutrophils, at the site of infection is an essential component of the inflammatory

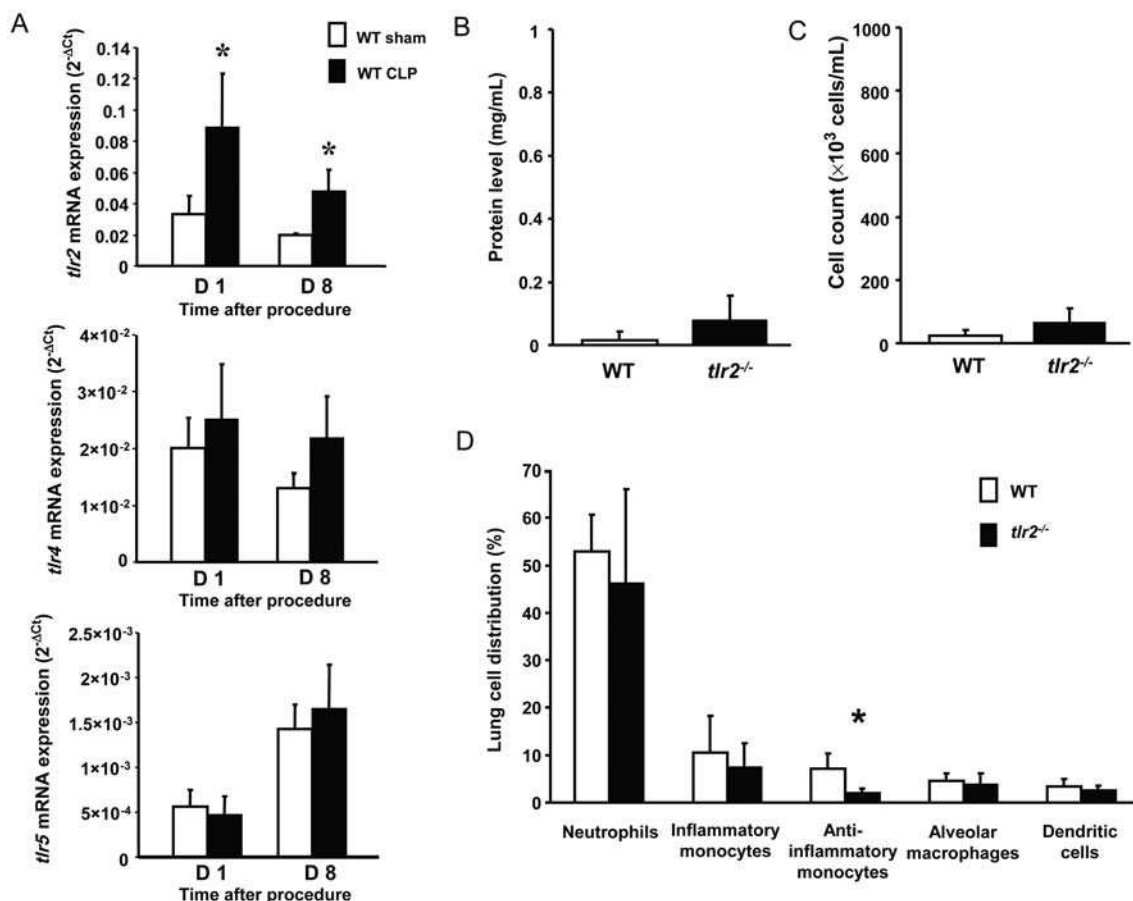


Figure 2. Polymicrobial sepsis increases the pulmonary expression of *tlr2* and induces minimal lung inflammation. *A*, The pulmonary expressions of *tlr2*, *tlr4*, and *tlr5* messenger RNA (mRNA) were assessed through real-time quantitative polymerase chain reaction in lung homogenates obtained from WT mice at early (day 1) and late (day 8) time points after sham surgery or cecal ligation and puncture (CLP). **P* < .05 for the comparison between mice that underwent sham surgery and those subjected to CLP (*n* = 4–6 animals per group). Prior to any bacterial intrapulmonary challenge, the extent of polymicrobial sepsis-induced lung injury was assessed in WT and *tlr2*^{-/-} mice on day 8 after CLP, through protein quantification (*B*) and cell counts (*C*) in bronchoalveolar lavage fluid and distribution of innate cells, including neutrophils, proinflammatory and anti-inflammatory monocytes, alveolar macrophages, and dendritic cells in the whole lung (*D*). **P* < .05 between WT and *tlr2*^{-/-} mice (*n* = 10–12 animals per group).

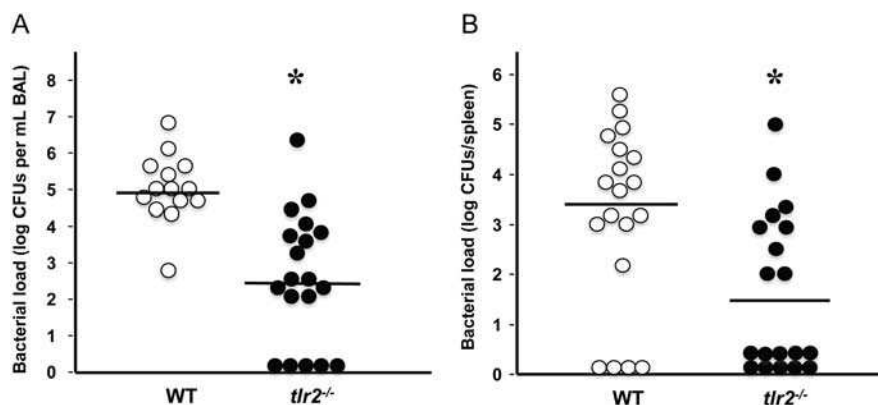


Figure 3. Postseptic *tlr2*^{-/-} mice display improvement in bacterial clearance. Wild-type (WT) and *tlr2*^{-/-} mice were subjected to cecal ligation and puncture. Survivors on day 8 were secondarily challenged by intratracheal instillation of *Pseudomonas aeruginosa* (5 × 10⁶ colony-forming units [CFUs]). *A*, Lung bacterial load was determined 24 hours after instillation, by quantitative cultures of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. *B*, Systemic dissemination was assessed by quantitative bacterial cultures of spleen homogenates. **P* < .05 between WT and *tlr2*^{-/-} mice (*n* = 15–20 animals per group).

response that aims to clear invading bacteria. We assessed lung recruitment of neutrophils and the resulting MPO activity in BAL fluid 4 hours and 24 hours after intratracheal instillation in postseptic WT and *tlr2*^{-/-} mice. In WT mice, we observed an early and massive recruitment of neutrophils (Figure 4A), which was associated with an increase in MPO activity after *P. aeruginosa* instillation (Figure 4B). In contrast, the recruitment of neutrophils was delayed in *tlr2*^{-/-} mice. At 24 hours, MPO activity was lower in *tlr2*^{-/-} mice, despite similar neutrophil counts at this time point. These data suggest that TLR2 upregulates early neutrophil recruitment and modulates neutrophil activation in this model. Differences in neutrophil influx between WT and *tlr2*^{-/-} mice were not related to differential productions of CXCL1 and CXCL2 chemokines (Figure 4C and 4D). To investigate whether TLR2 directly influenced intrinsic antibacterial functions of resident or recruited phagocytic cells in postseptic hosts, we studied bacterial uptake and killing capacities of neutrophils and alveolar

macrophages obtained from animals on day 8 after CLP. Bacterial uptake and killing capacities were not different in WT and *tlr2*^{-/-} neutrophils (Figure 5A) and alveolar macrophages (Figure 5B).

TLR2 Deficiency Dampens Inflammatory Lung Damage in Postseptic Mice

P. aeruginosa-induced lung damage was assessed by histological analysis of lung sections obtained 24 hours after intratracheal instillation. Both mouse strains displayed diffuse neutrophil infiltration and extensive foci of consolidation with loss of pulmonary structure (Figure 6A), with a trend toward smaller surfaces of consolidation in *tlr2*^{-/-} mice (Figure 6B). To characterize the effect of TLR2 deficiency on alveolocapillary membrane permeability, we measured the protein level in BAL fluid. At 4 and 24 hours after intratracheal instillation, *tlr2*^{-/-} mice displayed a marked decrease in the protein level,

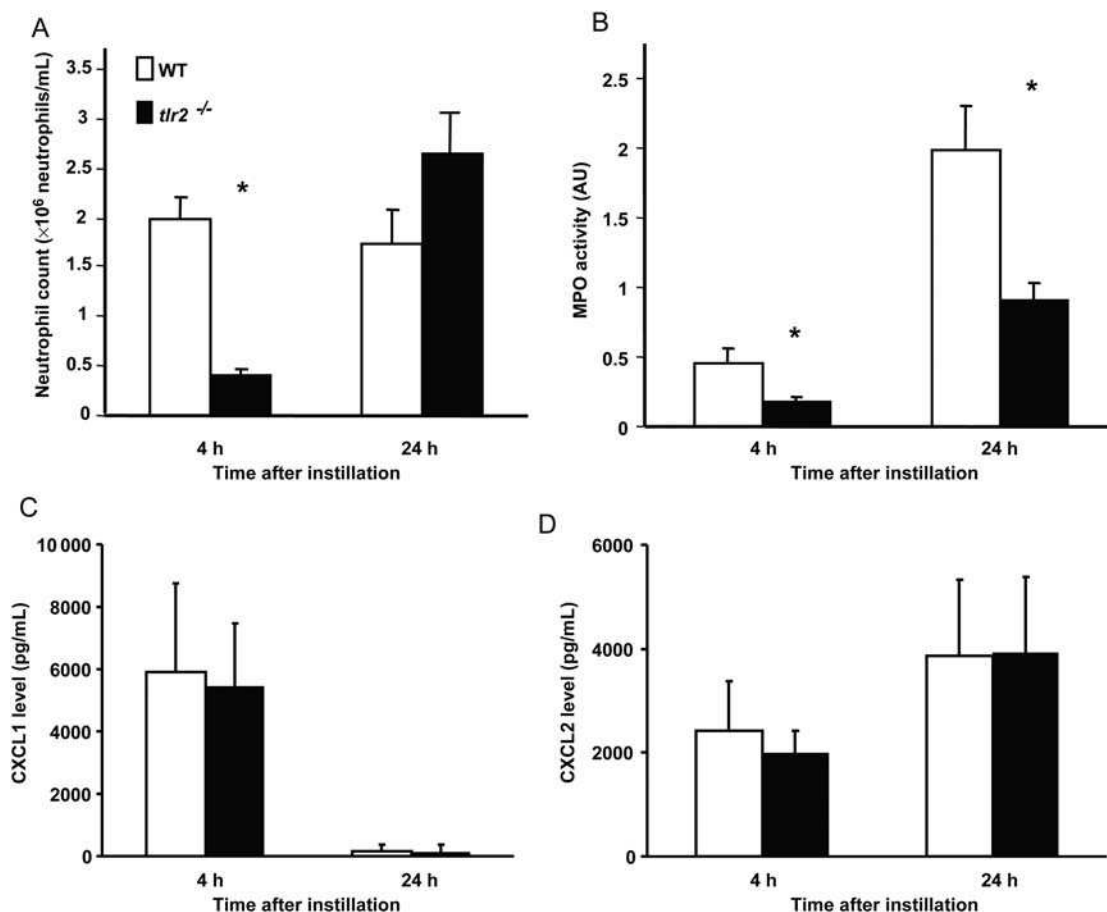


Figure 4. Toll-like receptor 2 modulates lung recruitment and activation of neutrophils in secondary *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Wild-type (WT) and *tlr2*^{-/-} mice subjected to cecal ligation and puncture were challenged at day 8 by intratracheal instillation of *P. aeruginosa*. *A*, The number of neutrophils was assessed in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid 4 hours and 24 hours after instillation. *B*, Neutrophil activation was assessed through myeloperoxidase (MPO) activity in BAL supernatants. *C* and *D*, CXCL1 and CXCL2 chemokines levels in BAL fluid were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. **P* < .05 between WT and *tlr2*^{-/-} mice (n = 10–12 animals per group).

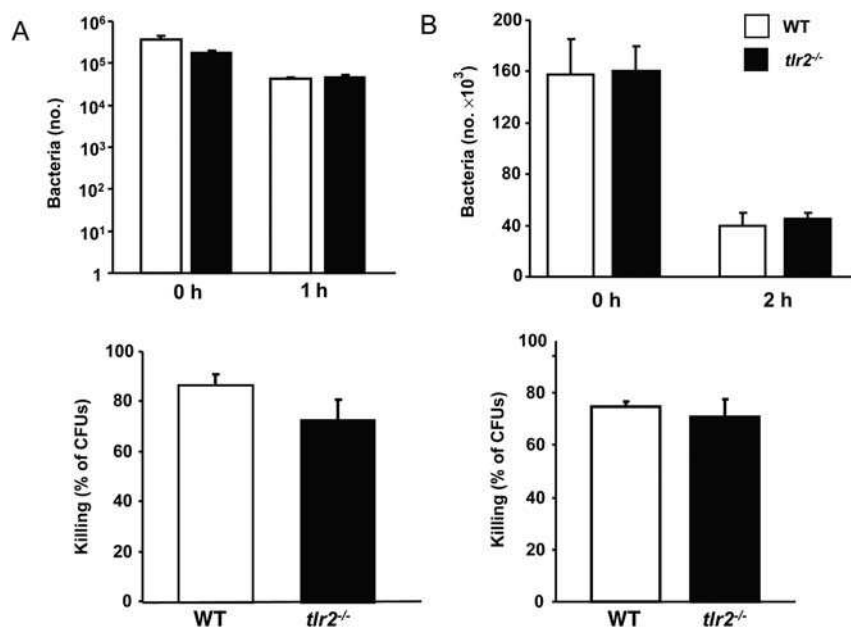


Figure 5. Toll-like receptor 2 does not impair antibacterial functions of neutrophils and alveolar macrophages. *A*, Neutrophils were purified from the bone marrow of wild-type (WT) and *tlr2*^{-/-} mice on day 8 after cecal ligation and puncture and were infected with *Pseudomonas aeruginosa* (multiplicity of infection, 100). Cells were washed with buffer containing tobramycin to remove extracellular bacteria and were lysed. Live intracellular bacteria were quantified by culture of lysates for determination of bacterial uptake ($t=0$) and intracellular killing ($t=1$ hour). Killing was calculated from the percentage of colonies present at $t=1$ hour as compared to $t=0$ hours, as follows: $100 - [\text{number of colony-forming units (CFUs)}_{t=1 \text{ hour}} / \text{number of CFUs}_{t=0 \text{ hour}}]$. The experiment shown is representative of 3 independent experiments performed in duplicates. *B*, Alveolar macrophages obtained from WT and *tlr2*^{-/-} mice on day 8 after cecal ligation and puncture were infected with *P. aeruginosa* (multiplicity of infection, 10). Extracellular bacteria were then removed by washing with tobramycin. Cells were lysed with reporter lysis buffer, and live intracellular bacteria were quantified by culture for determination of bacterial uptake ($t=0$) and intracellular killing ($t=2$ hours). Killing was calculated from the percentage of colonies present at $t=2$ hours as compared to $t=0$, as follows: $100 - [\text{number of CFUs}_{t=2 \text{ hours}} / \text{number of CFUs}_{t=0 \text{ hour}}]$. The experiment shown is representative of 3 independent experiments performed in duplicates.

indicating decreased alveolar lung damage in these animals (Figure 6C).

TLR2 Modulates Cytokine Lung Response in Postseptic Mice

A balanced and regulated production of pro- and anti-inflammatory cytokines is essential to eradicate the pathogen without promotion of tissue damage. We assessed the pulmonary levels of 4 major cytokines involved in antibacterial defense (TNF- α , IFN- γ , IL-10, and IL-17). First, we assessed mRNA expression through real-time quantitative PCR in lung homogenates 4 hours and 24 hours after intratracheal instillation. As compared to WT mice, *tlr2*^{-/-} mice displayed increased early (at 4 hours) expression of *tnfa* and decreased expression of *il10* at 24 hours (Figure 7A). Expression of *ifny* and *il17* was similar between both mouse strains. These results were confirmed by the quantification of cytokine levels in BAL fluid. Indeed, *tlr2*^{-/-} mice displayed higher concentrations of TNF- α 4 hours and 24 hours after intratracheal instillation of *P. aeruginosa* and lower concentrations of IL-10 after 24 hours (Figure 7B). These results suggest that TLR2 deficiency skews the cytokine balance toward a proinflammatory pattern that may promote bacterial clearance.

DISCUSSION

Several lines of evidence demonstrate that polymicrobial sepsis increases susceptibility to bacterial pneumonia. To delineate the molecular mechanisms that contribute to altering the defense against *P. aeruginosa* in the lungs of postseptic hosts, we assessed the influence of TLR-dependent pathways on host response in a clinically relevant model of secondary pneumonia. We found that TLR2 plays a critical role in the susceptibility to *P. aeruginosa* pneumonia in postseptic hosts: in contrast to WT mice, *tlr2*^{-/-} mice that underwent CLP resisted *P. aeruginosa* pulmonary infection through improvement of bacterial clearance, restoration of a local proinflammatory cytokine balance, and attenuation of lung damage.

TLR2, TLR4, and TLR5 are all involved in the recognition of specific molecular patterns expressed by *P. aeruginosa* and contribute in a redundant manner to cytokine and chemokine production in vitro [24, 32]. The respective contributions of all 3 receptors in host defense against *P. aeruginosa* have been clearly delineated in models of primary pneumonia. TLR4 or TLR5 deficiencies alter lung defense against primary *P. aeruginosa* pneumonia through impaired bacterial

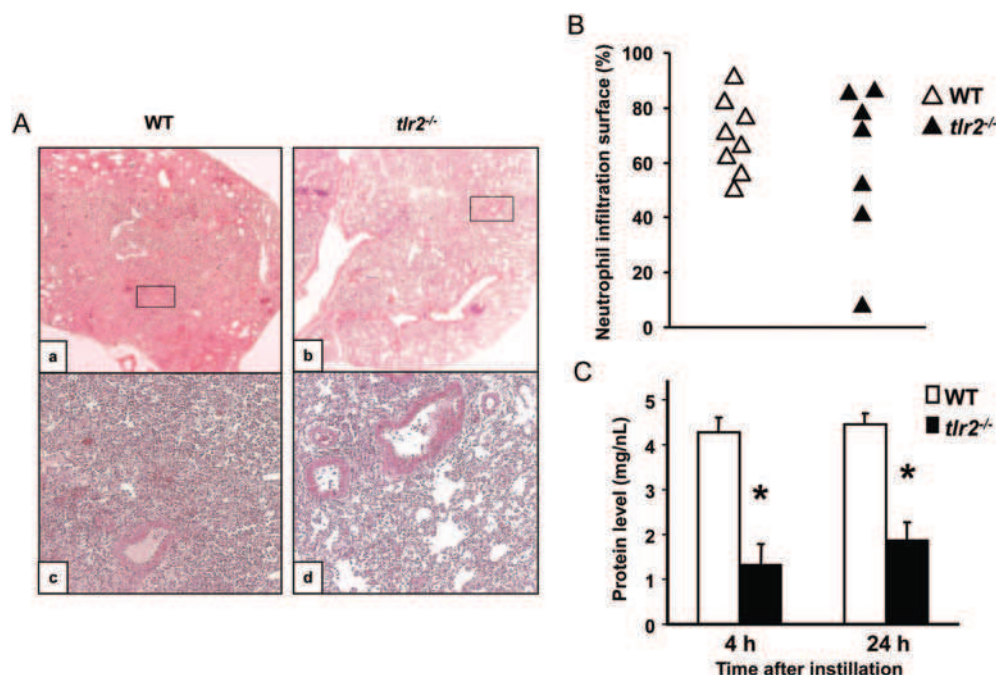


Figure 6. Toll-like receptor 2 deficiency attenuates inflammatory lung damage in secondary *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Wild-type (WT) and *tlr2*^{-/-} mice subjected to cecal ligation and puncture were challenged at day 8 by intratracheal instillation of *P. aeruginosa*. **A**, Lung damage was assessed by microscopic examinations of hematoxylin-eosin-stained lung sections from WT (a, c) and *tlr2*^{-/-} mice (b, d) 24 hours after intratracheal inoculation. **B**, Neutrophil infiltration and surface area of consolidation were quantified on histological slides by a blinded investigator (n = 7–8 animals per group). **C**, Epithelial permeability was assessed through quantification of proteins in bronchoalveolar lavage fluid 4 hours and 24 hours after bacterial instillation. **P* < .05 between WT and *tlr2*^{-/-} mice (n = 10–12 animals per group).

clearance [23, 26, 27]. Interestingly, mice subjected to CLP that were deficient for negative regulators of TLR4 (IRAK-M or ST2) display resistance to secondary *P. aeruginosa* pneumonia, thereby highlighting the importance of sustained TLR4 signaling in postseptic hosts' defense [33, 34]. Of note, TLR2 seems dispensable to mount an efficient immune response toward *P. aeruginosa* pulmonary infections in naive mice [24, 25]. In sharp contrast, our study identifies a harmful role for TLR2 in postseptic animals subjected to *P. aeruginosa* pneumonia.

To understand the protection against *P. aeruginosa* that is afforded by TLR2 deficiency in postseptic animals, we assessed several mechanisms related to the control of bacterial growth and to the inflammatory lung response. In vitro experiments failed to reveal any difference in antibacterial properties of alveolar macrophages and neutrophils isolated from WT and *tlr2*^{-/-} mice subjected to CLP. However, the behavior of these cells in vivo may differ depending on their cytokine environment. As compared to WT counterparts, postseptic *tlr2*^{-/-} mice displayed a different cytokine profile in response to a *P. aeruginosa* pulmonary infection. The most striking difference is the downregulation of IL-10 production and the restoration of a local proinflammatory balance in *tlr2*^{-/-} mice, which might contribute to improved bacterial clearance. A few

data suggest a specific role of TLR2 in the production of IL-10 and the repression of proinflammatory cytokine production. Stimulation of dendritic cells by TLR2 agonists leads to preferential production of IL-10, which is secondarily responsible for inhibition of interleukin 12p70 and IFN- γ production [35]. In addition, TLR2 up-regulates IL-10 production in response to stimulation by *Candida albicans* or the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica* [36, 37]. Furthermore, TLR2 might control the expansion, survival, and functions of immunosuppressive regulatory T cells [36, 38]. Accordingly, protection of *tlr2*^{-/-} mice has been linked to improved bacterial clearance in experimental models of fungal (*C. albicans*) or bacterial (*Y. enterocolitica* or *Burkholderia pseudomallei*) infection [36, 37, 39]. Finally, the decrease in anti-inflammatory monocytes in the lungs of postseptic *tlr2*^{-/-} animals might promote a proinflammatory cytokine response to a subsequent infectious challenge [40].

One of the hypotheses that could explain our findings is that polymicrobial sepsis could induce TLR2-mediated signals that may worsen lung injury or alter the local cytokine pattern. We failed to detect any difference in survival or in the extent of lung injury following polymicrobial sepsis in WT and *tlr2*^{-/-} mice, suggesting that, although the resistance

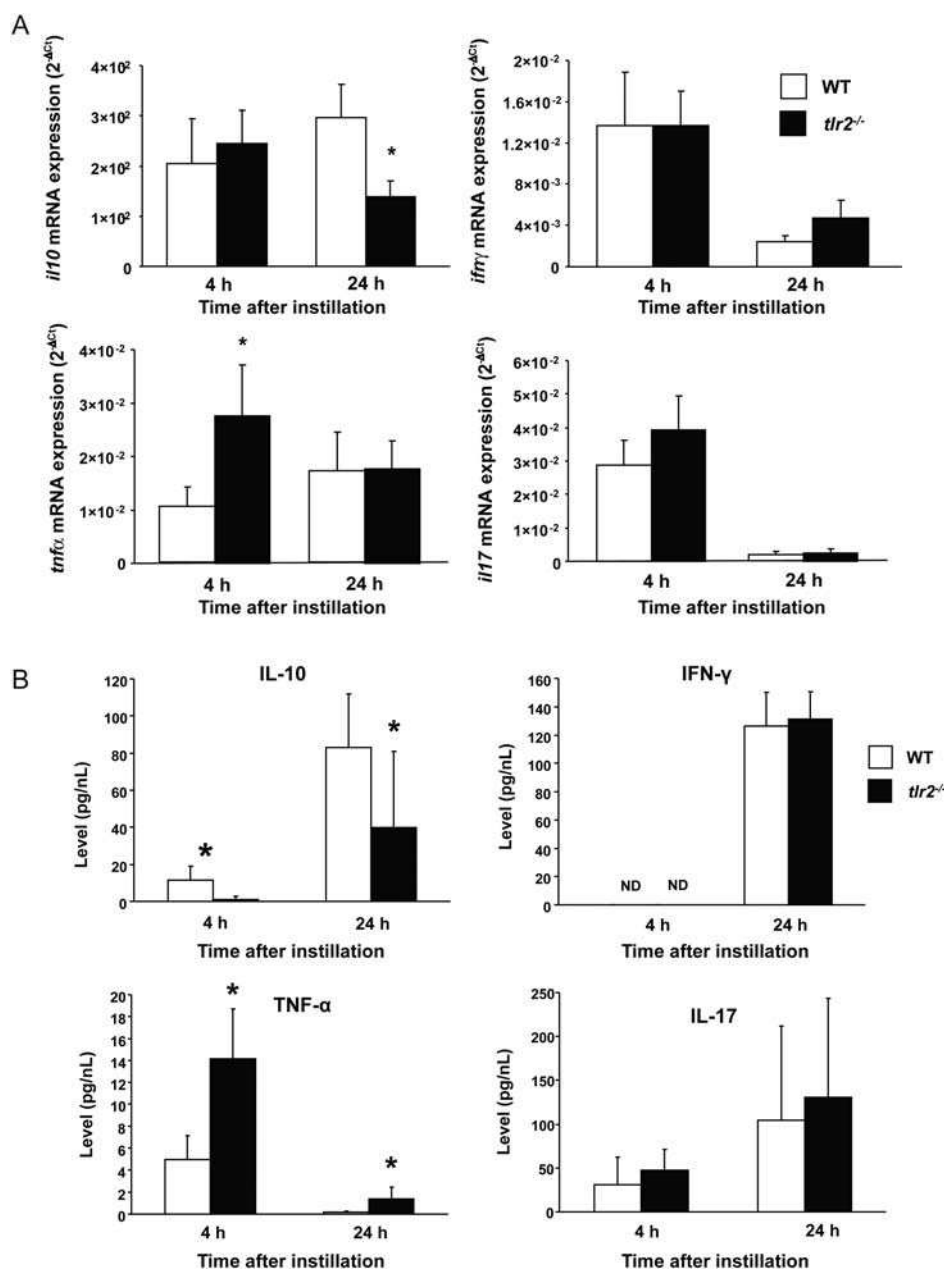


Figure 7. Toll-like receptor 2 modulates lung cytokine balance in secondary *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Wild-type (WT) and *tlr2*^{-/-} mice that underwent cecal ligation and puncture were challenged at day 8 by intratracheal instillation of *Pseudomonas aeruginosa*. **A**, The expression of *il10*, *ifnγ*, *tnfa*, and *il17* messenger RNA (mRNA) was assessed through real-time quantitative polymerase chain reaction in lung homogenates obtained from mice at early (4 hours) and late (24 hours) time points following *P. aeruginosa* administration. **B**, The cytokines interleukin 10 (IL-10), interferon γ (IFN- γ), tumor necrosis factor α (TNF- α), and interleukin 17 (IL-17) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay in bronchoalveolar lavage fluid obtained from mice at early (4 hours) and late (24 hours) time points following *P. aeruginosa* administration. **P* < .05 between WT and *tlr2*^{-/-} mice (*n* = 6–10 animals per group). Abbreviation: ND, not detectable.

of *tlr2*^{-/-} mice to secondary pneumonia is unlikely to be directly related to the outcome of CLP, it is related to the specific contribution of TLR2 to lung defense. Importantly, we and others observed a sustained increase in pulmonary expression of *tlr2* in mice that underwent CLP [41, 42], which might in turn exacerbate neutrophil influx and the inflammatory

response to subsequent stimulation by bacterial cell wall components [43, 44]. Accordingly, *tlr2*^{-/-} mice displayed a decreased number of neutrophils in infected lungs at 4 hours and reduced MPO activity after 24 hours, suggesting a sustained decrease in neutrophil activation. In addition to their essential role in bacterial uptake and killing, neutrophils may

also mediate lung damage [15, 45]. Whereas neutrophil depletion prior to polymicrobial sepsis impacts bacterial clearance, neutrophil depletion after infection is associated with reduced organ damage, suggesting that these cells are major determinants of tissue injury [46]. Interestingly, the role of TLR2 in the generation of reactive oxygen species by neutrophils in polymicrobial sepsis has been recently highlighted [47]. Moreover, TLR2 appears to be an oxidant sensor that may sustain the inflammatory process [48]. Together, these data suggest that TLR2 deficiency can dampen the early pulmonary recruitment and the excessive activation of neutrophils.

Finally, TLR2 may also worsen the extent of lung injury through a specific effect on the permeability of respiratory epithelial tight junctions [49]. In response to TLR2 stimulation by *P. aeruginosa*, gap junctions function to amplify proinflammatory signaling by communicating Ca^{2+} fluxes from stimulated to adjacent unstimulated cells and by increasing epithelial production of CXCL8 that contributes to recruit neutrophils into the infected lung. Furthermore, stimulation of TLR2 induces activation of calpains (Ca^{2+} -dependent cysteine proteases) that cleave the intercellular junction proteins occludin and E-cadherin, thereby promoting lung edema and trans-epithelial migration of neutrophils [50]. Accordingly, preserved epithelial barrier function may contribute to the decreased bacterial dissemination and improved outcome observed in *tlr2*^{-/-} mice.

In summary, by using a relevant model of secondary pneumonia in mice that underwent CLP, we show that TLR2 deficiency abolishes the susceptibility to *P. aeruginosa* in the setting of sepsis-induced immunosuppression. TLR2 deficiency prevents the increased IL-10 production observed in postseptic animals and is associated with improved pathogen clearance following secondary pulmonary infection. Whether the decreased susceptibility of *tlr2*^{-/-} mice is restricted to the gram-negative bacterium *P. aeruginosa* or can extend to alternative bacterial and nonbacterial pathogens remains to be evaluated. Finally, the clinical relevance of these experimental findings should be addressed by assessing the impact of functional polymorphisms of the *tlr2* gene on the risk of ICU-acquired *P. aeruginosa* pneumonia in septic patients.

Notes

Acknowledgments. We are grateful to the following individuals at Cochin Institute for their technical assistance: Muriel Andrieu (immunobiology facility), Maryline Favier (histology facility), Franck Letourneur (genomics facility), Veronique Fauveau (microsurgery facility), and everyone at the animal facilities.

Financial support. This work was supported by the European Society of Intensive Care Medicine (ECCRN Young Investigator Award) and the Société de Réanimation de Langue Française.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

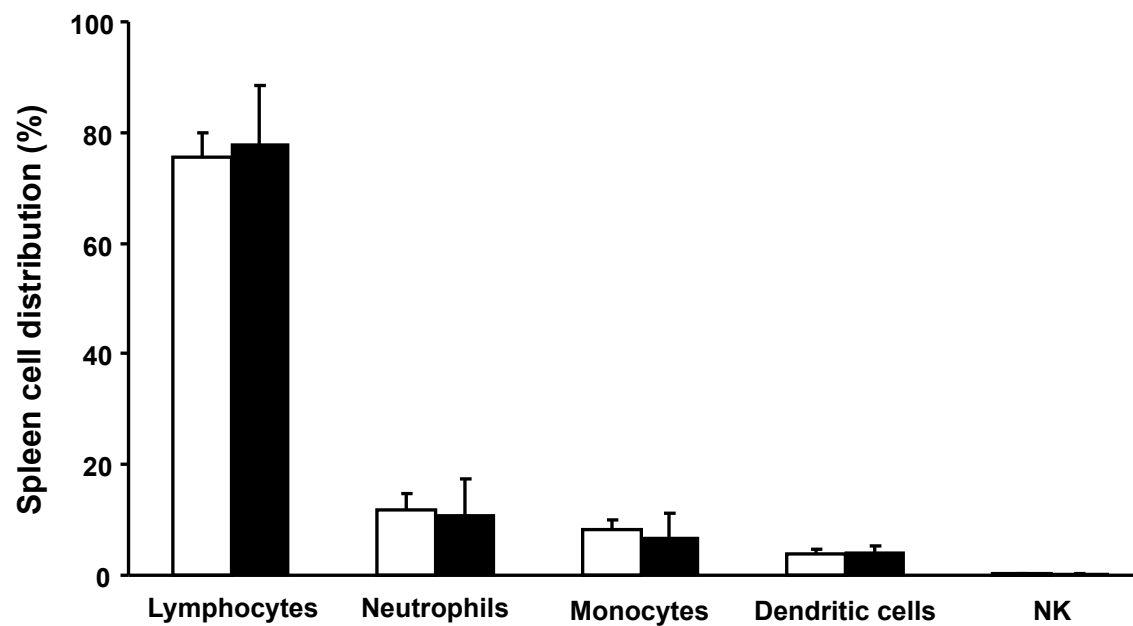
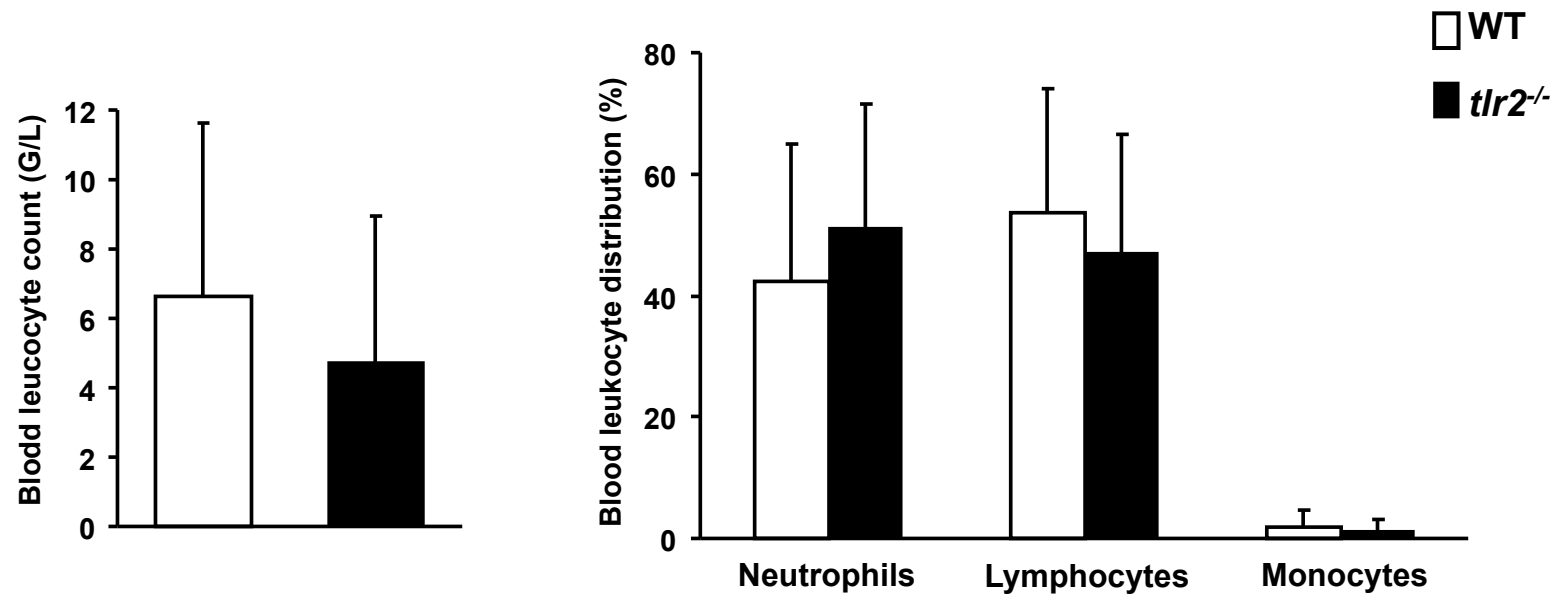
All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* **2003**; 348:1546–54.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* **2002**; 28:108–21.
- Landelle C, Lepape A, Francais A, et al. Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2008**; 29:1054–65.
- Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**; 165:867–903.
- Landelle C, Lepape A, Voirin N, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* **2010**; 36:1859–66.
- Wysocka M, Robertson S, Riemann H, et al. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J Immunol* **2001**; 166:7504–13.
- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* **1995**; 85:1341–7.
- Kell MR, Kavanaugh EG, Goebel A, Soberg CC, Lederer JA. Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. *Shock* **1999**; 12:139–44.
- Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- γ treatment. *Nat Med* **1997**; 3: 678–81.
- Caille V, Chiche JD, Nciri N, et al. Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock* **2004**; 22:521–6.
- Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* **2006**; 32:1175–83.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J Immunol* **2001**; 166:6952–63.
- Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* **2002**; 18:487–94.
- Monneret G, Debard AL, Venet F, et al. Marked elevation of human circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* **2003**; 31:2068–71.
- Pène F, Zuber B, Courtine E, et al. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol* **2008**; 181:8513–20.
- Guisset O, Dillhuydy MS, Thiebaut R, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med* **2007**; 33:148–52.
- Grimaldi D, Louis S, Pène F, et al. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med* **2011**; 37:1438–46.
- Cheron A, Floccard B, Allaouchiche B, et al. Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma. *Crit Care* **2010**; 14:R208.
- Venet F, Tissot S, Debard AL, et al. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med* **2007**; 35:1910–7.
- Steinhauser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* **1999**; 162:392–9.
- Chen GH, Reddy RC, Newstead MW, Tateda K, Kyasapura BL, Standiford TJ. Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. *J Immunol* **2000**; 165: 6496–503.

22. Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol* **2003**; 163: 2605–17.
23. Faure K, Sawa T, Ajayi T, et al. TLR4 signaling is essential for survival in acute lung injury induced by virulent *Pseudomonas aeruginosa* secreting type III secretory toxins. *Respir Res* **2004**; 5:1.
24. Skerrett SJ, Wilson CB, Liggitt HD, Hajjar AM. Redundant toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2007**; 292: L312–22.
25. Ramphal R, Balloy V, Huerre M, Si-Tahar M, Chignard M. TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Immunol* **2005**; 175:3927–34.
26. Ramphal R, Balloy V, Jyot J, Verma A, Si-Tahar M, Chignard M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J Immunol* **2008**; 181: 586–92.
27. Morris AE, Liggitt HD, Hawn TR, Skerrett SJ. Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute *P. aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2009**; 297:L1112–9.
28. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* **2005**; 5:58–68.
29. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, Davis CG, McDunn JE, Hotchkiss RS. Deletion of MyD88 markedly attenuates sepsis-induced T and B lymphocyte apoptosis but worsens survival. *J Leukoc Biol* **2008**; 83:1009–18.
30. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* **2007**; 204: 1463–74.
31. Pène F, Courtine E, Ouaz F, et al. Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect Immun* **2009**; 77:5651–8.
32. Raoult E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R, Chignard M. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One* **2009**; 4:e7259.
33. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J Clin Invest* **2006**; 116:2532–42.
34. Hoogerwerf JJ, Leendertse M, Wieland CW, et al. Loss of suppression of tumorigenicity 2 (ST2) gene reverses sepsis-induced inhibition of lung host defense in mice. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**; 183: 932–40.
35. Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* **2004**; 173:7548–55.
36. Netea MG, Sutmoller R, Hermann C, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* **2004**; 172:3712–8.
37. Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, et al. Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* **2002**; 196:1017–24.
38. Sutmoller RP, den Brok MH, Kramer M, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* **2006**; 116:485–94.
39. Wiersinga WJ, Wieland CW, Dessing MC, et al. Toll-like receptor 2 impairs host defense in gram-negative sepsis caused by *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis). *PLoS Med* **2007**; 4:e248.
40. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **2009**; 27:669–92.
41. Williams DL, Ha T, Li C, et al. Modulation of tissue toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* **2003**; 31:1808–18.
42. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* **2005**; 105:3588–95.
43. Matsuda N, Yamazaki H, Takano K, et al. Priming by lipopolysaccharide exaggerates acute lung injury and mortality in responses to peptidoglycan through up-regulation of Toll-like receptor-2 expression in mice. *Biochem Pharmacol* **2008**; 75:1065–75.
44. Li Y, Xiang M, Yuan Y, et al. Hemorrhagic shock augments lung endothelial cell activation: role of temporal alterations of TLR4 and TLR2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2009**; 297:R1670–80.
45. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* **2006**; 368:157–69.
46. Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, et al. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock* **2005**; 24:40–7.
47. Zou L, Feng Y, Zhang M, Li Y, Chao W. Nonhematopoietic Toll-like receptor 2 contributes to neutrophil and cardiac function impairment during polymicrobial sepsis. *Shock* **2011**; 36:370–80.
48. Paul-Clark MJ, McMaster SK, Sorrentino R, et al. Toll-like receptor 2 is essential for the sensing of oxidants during inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**; 179:299–306.
49. Martin FJ, Prince AS. TLR2 regulates gap junction intercellular communication in airway cells. *J Immunol* **2008**; 180:4986–93.
50. Chun J, Prince A. TLR2-induced calpain cleavage of epithelial junctional proteins facilitates leukocyte transmigration. *Cell Host Microbe* **2009**; 5:47–58.

Supplemental figure for reviewers



CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Les infections nosocomiales sont à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité considérables chez les patients de réanimation et représentent ainsi une problématique majeure de santé publique, exacerbée par le développement préoccupant des bactéries multi-résistantes dans ce contexte. La prévention de ces complications infectieuses repose avant tout sur des mesures d'hygiène dont l'efficacité sur des facteurs de risque modifiables est incontestable. Cependant, l'hygiène hospitalière seule ne peut prétendre à faire disparaître ces complications infectieuses. En effet, la gravité des pathologies prises en charge, les comorbidités des patients sont des facteurs de risque majeurs et non modifiables de la survenue de ce type de complication. Par ailleurs, il apparaît de plus en plus clairement que les patients présentent également une immunodépression acquise qui pourrait favoriser la survenue des infections nosocomiales.

L'objectif ambitieux de notre travail était d'identifier certains mécanismes cellulaires ou moléculaires expliquant les liens entre la réaction inflammatoire du sepsis et la susceptibilité aux infections nosocomiales. Grâce à l'interaction particulière qui existe entre le service de réanimation médicale de l'hôpital Cochin et notre laboratoire de recherche au sein de l'Institut Cochin, nous avons pu développer une approche translationnelle originale, en réalisant d'une part des études longitudinales chez des patients septiques de réanimation et d'autre part en modélisant une situation clinique fréquente dans un modèle animal. Nos résultats peuvent être résumés ainsi :

i) des anomalies acquises quantitatives et fonctionnelles des cellules dendritiques sont associées au développement des infections nosocomiales au cours du sepsis chez l'homme. En accord avec les résultats obtenus dans les modèles animaux, ces données suggèrent une implication fonctionnelle de ces cellules dans la défense anti-infectieuse du patient en phase post-septique. Cependant les mécanismes effecteurs produits par des cellules dendritiques dans ce contexte demeurent imparfaitement compris y compris dans les modèles animaux où

les cellules dendritiques semblent à la fois capables d'orienter la réponse immunitaire adaptative mais également de manière plus inattendue, de réguler la réponse inflammatoire pulmonaire au cours des pneumonies secondaires à *P. aeruginosa*.

ii) le sepsis bactérien induit une diminution marquée des lymphocytes T innés de type MAIT, dont la persistance est également associée au développement d'infections nosocomiales chez les patients de réanimation. Cependant l'implication effective de ces cellules dans la physiopathologie des infections secondaires de l'hôte septique demeure évasive et justifie des études expérimentales animales pour étudier les mécanismes éventuels qui sous-tendent cette association. La disponibilité de souris transgéniques enrichies en MAIT ou au contraire incapable d'activer les MAIT devrait nous permettre d'avancer dans cette voie de recherche en leur appliquant notre modèle expérimental de double agression infectieuse séquentielle.

iii) à l'aide d'un modèle murin de double agression infectieuse séquentielle, nous avons démontré que le récepteur TLR2 est un déterminant majeur dans la susceptibilité aux pneumonies secondaires à *P. aeruginosa*. Il serait particulièrement intéressant d'évaluer si des polymorphismes fonctionnels inhibiteurs du gène *tlr2* chez des patients sont capables de conférer une telle protection vis des pneumonies nosocomiales à *P. aeruginosa*.

Si l'ensemble de ce travail nous semble représenter une contribution significative dans la compréhension de l'immunodépression induite par le sepsis, il soulève également de nombreuses questions laissées sans réponses et appelle certains commentaires.

1. L'immunodépression post-agressive : une entité commune ?

Notre travail s'est principalement focalisé sur le sepsis et ses conséquences immunologiques. Néanmoins, nous pensons que l'inclusion de patients de réanimation présentant un état de choc non-septique dans nos études translationnelles représente un contrôle interne nécessaire. En effet, il est maintenant bien établi que des états inflammatoires aigus d'origine non-infectieuse comme la pancréatite aiguë, le polytraumatisme ou le syndrome post-ressuscitation après arrêt cardiaque, partagent des caractéristiques physiopathologiques communes avec le sepsis et peuvent également s'accompagner de dysfonctions immunitaires acquises (328). Par exemple, des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion induit par un choc hémorragique retrouve une déplétion des cellules dendritiques spléniques (329). De plus, des souris soumises à un choc hémorragique présentent une susceptibilité accrue à une pneumonie secondaire à *Staphylococcus aureus* (330) mimant ainsi le phénotype que nous avons observé dans le modèle d'infection polymicrobienne suivie d'une pneumonie à *Pseudomonas*. Ces données soulignent l'absence de spécificité de la réponse inflammatoire envers une agression infectieuse ou non-infectieuse. Elles suggèrent l'existence d'un continuum physiopathologique dans le développement des désordres immunitaires qui s'associe à cette réponse inflammatoire.

2. Pertinence des modèles animaux d'inflammation aiguë

Le terme « immunodépression » représente communément une entité clinique traduisant la susceptibilité de l'hôte envers une infection en termes de morbidité et de mortalité, mais ne préjuge pas des mécanismes responsables des défaillances d'organes. La complexité de la dysfonction immunitaire post-infectieuse ne peut, pour le moment, être appréhendée qu'à travers des modèles expérimentaux pertinents. De fait, les études expérimentales animales ont permis de faire évoluer la notion classique d'immunoparalysie vers une entité plus générale

de dysfonction immunitaire induite par le sepsis qui nous semble refléter de manière plus adéquate la dysrégulation de la réponse immunitaire de l'hôte septique envers une agression infectieuse secondaire. La pertinence des modèles animaux de sepsis utilisés en recherche expérimentale par rapport aux situations cliniques habituellement rencontrées est un problème largement débattu (331). Bien que les protocoles expérimentaux s'attachent à limiter au maximum les facteurs potentiellement confondants, certains facteurs sont négligés. Ainsi, il est clairement établi que l'âge, et en particulier la sénescence cellulaire, modifie les fonctions des cellules immunitaires et la réponse aux stimuli infectieux (332) par ailleurs, la réponse inflammatoire innée est maintenue voire exacerbée chez les souris d'animalerie (333). La grande majorité des travaux en immunologie est réalisée sur des souris jeunes (2-3 mois), qui ne reflète pas l'âge habituellement plus élevé des patients septiques de réanimation (environ 60 ans). La réponse de différentes souches de souris envers un stimulus infectieux donné peut également varier. Par ailleurs, les comorbidités et les traitements immunosuppresseurs sont des facteurs rarement pris en compte dans les travaux expérimentaux. L'ensemble de ces facteurs a été souligné par une étude récente comparant les réponses transcriptomiques de souris et de patients soumis à différentes agressions (sepsis, injection d'endotoxine, brûlure grave, polytraumatisme sévère, choc hémorragique) rapportées par différents groupes. Il ressort de cette étude que les différentes agressions induisent des réponses transcriptomiques similaires au sein de la même espèce, mais qu'il existe des variations importantes d'une espèce à l'autre pour une même agression (**Figure 10**) (334).

dernières années explique certaines discordances observées entre modèles animaux et phénotype humains que ce soit en termes d'immunopathologie ou de réponse thérapeutique. La théorie classique issue des modèles murins qui postulait que la réponse inflammatoire exacerbée de l'hôte était responsable des défaillances d'organes et de la mortalité au cours des infections graves a été largement remise en question par les échecs thérapeutiques répétés et la mise en évidence du rôle délétère de la réponse anti-inflammatoire. La théorie du « Damage-response Framework » des Dr Casadevall et Pirofski (cf chapitre 3 de l'introduction), permet, elle, d'appréhender le rôle pathologique du pathogène et la contribution nécessaire de la réponse immune à son éradication. Elle apporte néanmoins une vision qui reste dichotomique. En effet, de nombreux microorganismes ont développé des stratégies pour résister, échapper ou neutraliser les mécanismes de défense de l'hôte (335). L'interaction d'un hôte et d'un pathogène peut parfois entraîner une réponse immune à la fois excessive pour l'hôte et inefficace pour éradiquer le pathogène ce qui contribuera à sa gravité. La variabilité de la notion de « virulence » que ce soit au cours du processus d'invasion tissulaire ou plus généralement au long de l'évolution des espèces complique encore l'interaction hôte-pathogène. Ainsi jusque dans les années 80, La virulence était considérée comme une propriété intrinsèque des pathogènes certains germes étant considérés virulents comme les bactéries à Gram négatif qui représentaient la majorité des causes de sepsis, et d'autres non. L'épidémiologie bactérienne des infections sévères s'est depuis modifiée avec une prédominance d'infections à bactéries à Gram positif (5, 11) et l'émergence d'infections causées par des microbes considérés comme non pathogène dans les années 80 : staphylocoques à coagulase négative et levures (336, 337). En effet, l'utilisation accrue de matériel implantable favorise les espèces bactériennes capables de former du biofilm (nouvelle propriété de « virulence »), l'augmentation de la consommation d'antibiotiques donne un avantage à des espèces moins sensibles aux antibiotiques ou développant plus

facilement des résistances. La notion de virulence est également relative entre les espèces, tel pathogène étant virulent chez un hôte mais inoffensif chez un autre. De fait, la théorie du « Damage-response Framework » se heurte à la variabilité des rôles respectifs de l'hôte et du pathogène en fonction de leur espèce respective, selon le site d'infection voire le moment de sa survenue (338). Les progrès dans la compréhension des interactions complexes et dynamiques qui existent entre les pathogènes et les mécanismes de défense de l'hôte ont amené Casadevall et Pirofski à développer une vision plus moderne de leur théorie. A leurs yeux, la relativité des facteurs associés à l'hôte et au pathogène rend impossible la prédiction de la sévérité. L'expression biologique d'une infection ne peut pas être prédite à partir des caractéristiques de l'hôte ou du pathogène pris isolément. Elle doit donc être appréhendée comme une « Emergent Property » c'est à dire une caractéristique biologique émergent de l'interaction entre l'hôte et le pathogène (336) ou l'émergence est le concept qui intervient lorsque des systèmes font apparaître par leurs interactions un autre niveau de complexité qu'il est difficile de prévoir par la seule analyse de ces systèmes pris isolément. Pour illustrer ce fait, nous pouvons rapporter le cas d'un patient présentant une cellulite nécrosante de jambe avec choc septique et coagulation intra-vasculaire disséminée intense. Alors que les cellulites nécrosantes des membres sont en général causées par *Streptococcus pyogenes* ou *Staphylococcus aureus* et que la CIVD est une caractéristique des infections à méningocoque ou à pneumocoque, nous avons identifié chez notre patient un *Escherichia coli* dans les prélèvements opératoires. Ces atypies microbiologiques et cliniques nous avait conduits à génotyper la bactérie et le patient. Nous avons mis en évidence que la souche bactérienne exprimait 2 facteurs (*cnfI* et *var*) induisant une cytotoxicité cellulaire et une nécrose cutanée, alors que le patient présentait un polymorphisme du gène de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) qui augmente le risque de CIVD au cours des états septiques (339). Ce cas est une illustration didactique de la complexité de la relation hôte-pathogène appréhendée

comme un système biologique ou la variabilité des 2 acteurs aboutit à un nombre considérable de situations pathologiques possibles. Malheureusement, les limites technologiques, la séparation épistémologique entre microbiologie et immunologie font que les études portent souvent sur l'une des 2 composantes de l'interaction hôte-pathogène considérée isolément de l'autre. Les conséquences pour le sujet de l'immunodépression post-infectieuse sont particulièrement importantes : les modèles expérimentaux utilisent des lignées de souris différentes, des agressions primaires variables, des délais et des pathogènes propres à chaque équipe ; la comparaison des données obtenues et leur caractère généralisable sont donc incertaines. Par exemple, certains des phénotypes murins que nous avons observé sont différents lorsqu'on utilise un autre pathogène ou un autre site de l'infection secondaire (données non publiées). A notre sens, seules des études à larges échelles, collaboratives, incluant de nombreux types différents d'infection primaire et d'infection secondaire (organe infecté, type de pathogène utilisé) et utilisant des technologies de haut débit et l'aide d'outils bioinformatiques pourraient être à même de définir les mécanismes immunitaires les plus constants entre les différents modèles qu'il conviendrait de valider ensuite chez l'homme et qui définiraient les cibles thérapeutiques à privilégier.

4. Quelle place pour l'immunomonitorage en réanimation ?

Ces considérations soulignent l'hétérogénéité de réponse anti-infectieuse qui peut exister entre les patients, et plaident pour une approche individualisée dans l'évaluation des anomalies immunologiques acquises en réanimation. Plusieurs études ont mis en évidence des associations statistiques entre des anomalies immunologiques acquises en réanimation (désactivation des monocytes, lymphopénie, déplétion des CDs, déplétion des MAIT) et le pronostic global ou le développement d'infections nosocomiales. A ce jour les données les plus robustes concernent le rôle pronostique de la diminution d'expression de HLA-DR au cours du temps. Dans le futur, il conviendra de confronter ces différents paramètres

immunologiques entre eux et aux facteurs de risque cliniques habituels d'infections nosocomiales. Une telle étude nécessitera un effectif important de patients et ne peut s'envisager qu'à une échelle multicentrique. Les résultats pourraient permettre d'une part d'établir formellement l'implication des dysfonctions immunitaires acquises dans le développement des infections nosocomiales voire dans le pronostic global, d'identifier le biomarqueur le plus performant d'immunodépression post-agressive, et enfin d'identifier les patients éventuellement susceptibles de bénéficier d'interventions thérapeutiques particulières. (340). L'immunomonitorage constitue en ce sens un pas supplémentaire vers une médecine individualisée s'adaptant au cours du temps aux fluctuations de l'état des patients (341).

5. Perspectives thérapeutiques : l'immunomodulation

Les perspectives thérapeutiques qu'ouvrent les avancées récentes sur la compréhension des mécanismes de l'immunodépression post-infectieuse sont encore balbutiantes. Elles pourraient être des thérapies moléculaires, ciblant une voie de signalisation altérée du système immunitaire ou bien cellulaires visant à reconstituer des fonctions immunitaires par l'injection de cellules compétentes.

Dans les thérapies moléculaires, celles qui ciblent l'apoptose des lymphocytes et des cellules dendritiques observées au décours d'une infection grave, paraissent séduisantes. Deux molécules anti-apoptotiques sont particulièrement prometteuses :

- L'IL-7 est une molécule qui favorise la survie des lymphocytes. Dans des modèles expérimentaux murins, l'administration d'IL-7 permettait de prévenir l'apoptose lymphocytaire induite par une LPC et contribuait ainsi à une amélioration de la survie des animaux lors de l'infection primaire mais également lorsque les souris étaient soumises à une fongémie secondaire à *Candida* (317, 342). Chez l'homme, l'IL-7 permettait de restaurer *ex vivo* les fonctions des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ (prolifération, sécrétion d'IFN-γ...) prélevés

chez des patients septiques (343). L'administration humaine d'IL-7 est déjà en cours dans des études pilotes concernant l'infection par le VIH et la pathologie cancéreuse.

- La molécule Flt3-L, ligand du récepteur Flt3 stimule la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques en cellules dendritiques. En cela, elle peut être considérée comme le principal facteur de croissance des cellules dendritiques. Compte tenu de l'apoptose des cellules dendritiques induites par le sepsis et des données suggérant un bénéfice à l'administration de cellules dendritiques chez l'animal septique, il est tentant de bloquer l'apoptose de ces cellules et de favoriser leur prolifération. L'administration de Flt3-L est ainsi capable d'accélérer le processus de repopulation des CD et de restaurer leurs fonctions après administration de LPS (344) .

Ces stratégies d'inhibition de l'apoptose apparaissent séduisantes mais leur application en clinique se heurte une fois de plus aux limites des modèles animaux. En effet, leur efficacité dans les modèles murins est basée sur une administration très précoce (de l'ordre de quelques heures après le début de l'infection). Chez l'homme, il est difficile de dater formellement le début de l'invasion bactérienne et les patients sont finalement admis en réanimation relativement tardivement en raison des défaillances d'organes. Par ailleurs, ces cytokines ont un potentiel pro-inflammatoire potentiellement délétère au cours des infections. L'efficacité et la sécurité de ces molécules en phase tardive mériteraient d'être également évaluées avant de pouvoir envisager une application thérapeutique en clinique. Enfin il existe un risque théorique de carcinogénèse. En effet, l'activation constitutive du récepteur Flt3 représente un mécanisme oncogénique majeur de certaines leucémies aiguës myéloblastiques.

Les autres thérapies moléculaires visent à favoriser les fonctions immunostimulantes des cellules de l'immunité. Ces stratégies d'immunomodulation des dysfonctions immunitaires induites par le sepsis reposent principalement sur l'utilisation de l'IFN- γ ou du GM-CSF et se sont focalisées sur les monocytes. L'IFN- γ peut inhiber la tolérance au LPS et

a de nombreux effets immunomodulateurs (augmentation de l'expression du CMHII, de la production d'IL-12, du recrutement de leucocytes et activation des fonctions antimicrobiennes) potentiellement bénéfiques au cours du choc septique (264, 345). A la suite d'une injection d'endotoxine chez des volontaires sains, l'IFN- γ permettait de réduire les dysfonctions immunes (346). Le facteur de croissance GM-CSF est capable de réverser *in vitro* la désactivation des monocytes induite par des états inflammatoires aigus (347). Dans une étude pilote, le GM-CSF a été administré à 9 patients porteurs de sepsis sévère et a effectivement permis de restaurer les fonctions des monocytes (348). Dans une étude clinique pilote randomisée de phase II, l'administration de GM-CSF à des patients de réanimation septiques présentant une déactivation des monocytes permettait d'augmenter l'expression d'HLA-DR à la surface des monocytes, et de restaurer la production de cytokines inflammatoires. Cependant, les résultats sur les critères d'évaluation cliniques étaient relativement décevants, avec certes une diminution de la durée de ventilation mécanique mais une absence d'effet sur la mortalité (349). De plus on déplore l'absence totale d'information sur le développement éventuel d'infections nosocomiales dans cette étude. Une étude plus large multicentrique et indispensable pour démontrer la réalité du bénéfice clinique d'une telle stratégie.

A plus long terme, si le rôle délétère de TLR2 venait à être confirmé, diverses stratégies thérapeutiques pourraient viser à inhiber les fonctions de TLR2 : inhalation par aérosol ou administration systémique de peptides antagonistes, de récepteur solubles, inhibition à l'échelle transcriptionnelle de la traduction de TLR2 induite par le sepsis ...

Enfin, sur la base des résultats obtenus chez la souris, il est possible d'envisager à terme des thérapies cellulaires avec la génération de cellules dendritiques *ex vivo* à partir de cellules souches hématopoïétiques, ou la différenciation de lymphocytes en sous-populations

effectrices, Ce défi thérapeutique est cependant immense au vu des difficultés techniques à résoudre et de l'inocuité de la thérapie cellulaire qu'il faudrait démontrer.

BIBLIOGRAPHIE

1. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13(6):607-615.
2. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992;101(6):1481-1483.
3. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31(4):1250-1256.
4. Alberti C, Brun-Buisson C, Chevret S, et al. Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005;171(5):461-468.
5. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348(16):1546-1554.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-1310.
7. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, et al. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003;168(2):165-172.
8. Harrison DA, Welch CA, Eddleston JM. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database. *Crit Care* 2006;10(2):R42.
9. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007;35(5):1244-1250.
10. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002;28(2):108-121.
11. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34(2):344-353.
12. Dhainaut JF, Claessens YE, Janes J, et al. Underlying disorders and their impact on the host response to infection. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 7:S481-489.
13. Danai PA, Moss M, Mannino DM, et al. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest* 2006;129(6):1432-1440.
14. Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis* 2006;6(10):653-663.
15. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 1995;274(12):968-974.
16. Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, et al. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003;168(1):77-84.
17. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* 2005;24(4):300-312.
18. Bochud PY, Bochud M, Telenti A, et al. Innate immunogenetics: a tool for exploring new frontiers of host defence. *Lancet Infect Dis* 2007;7(8):531-542.
19. Joram N, Lopez E, Texereau J, et al. [Genetic polymorphisms and infections]. *Med Mal Infect* 2006;36(6):314-321.
20. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, et al. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 7:S408-415.

21. Wurfel MM, Gordon AC, Holden TD, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008;178(7):710-720.
22. Mira JP, Cariou A, Grall F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999;282(6):561-568.
23. Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006;173(12):1335-1341.
24. Kotb M, Norrby-Teglund A, McGeer A, et al. An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nat Med* 2002;8(12):1398-1404.
25. Hermans PW, Hazelzet JA. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphism and sepsis. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 7:S453-458.
26. Bougle A, Max A, Mongardon N, et al. Protective effects of FCGR2A polymorphism in invasive pneumococcal diseases. *Chest* 2012;142(6):1474-1481.
27. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007;33(4):606-618.
28. Ferrer R, Artigas A, Suarez D, et al. Effectiveness of treatments for severe sepsis: a prospective, multicenter, observational study. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009;180(9):861-866.
29. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010;36(2):222-231.
30. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345(19):1368-1377.
31. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34(6):1589-1596.
32. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA* 1995;273(12):934-941.
33. Reinhart K, Menges T, Gardlund B, et al. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med* 2001;29(4):765-769.
34. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, et al. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987;317(11):653-658.
35. Opal SM, Laterre PF, Francois B, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 2013;309(11):1154-1162.
36. Sprung CL, Annane D, Keh D, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008;358(2):111-124.
37. Annane D, Cariou A, Maxime V, et al. Corticosteroid treatment and intensive insulin therapy for septic shock in adults: a randomized controlled trial. *Jama* 2010;303(4):341-348.
38. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, et al. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med* 2008;358(2):125-139.
39. Takala J, Ruokonen E, Webster NR, et al. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *N Engl J Med* 1999;341(11):785-792.

40. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012;366(22):2055-2064.
41. Abraham E, Reinhart K, Opal S, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290(2):238-247.
42. Wunderink RG, Laterre PF, Francois B, et al. Recombinant tissue factor pathway inhibitor in severe community-acquired pneumonia: a randomized trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;183(11):1561-1568.
43. Jaimes F, De La Rosa G, Morales C, et al. Unfractionated heparin for treatment of sepsis: A randomized clinical trial (The HETRASE Study). *Crit Care Med* 2009;37(4):1185-1196.
44. Warren BL, Eid A, Singer P, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286(15):1869-1878.
45. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013;39(2):165-228.
46. Angus DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA* 2011;306(23):2614-2615.
47. For sepsis, the drugs don't work. *Lancet Infect Dis* 2012;12(2):89.
48. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, et al. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30(4):580-588.
49. Quartin AA, Schein RM, Kett DH, et al. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *Jama* 1997;277(13):1058-1063.
50. Decoster A, Grandbastien B, Demory MF, et al. A prospective study of nosocomial-infection-related mortality assessed through mortality reviews in 14 hospitals in Northern France. *J Hosp Infect* 2012;80(4):310-315.
51. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995;274(8):639-644.
52. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;165(7):867-903.
53. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis* 1989;139(4):877-884.
54. Brun-Buisson C, Roudot-Thoraval F, Girou E, et al. The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med* 2003;29(9):1464-1471.
55. Bekaert M, Timsit JF, Vansteelandt S, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;184(10):1133-1139.
56. Zingg W, Walder B, Pittet D. Prevention of catheter-related infection: toward zero risk? *Curr Opin Infect Dis* 2011;24(4):377-384.
57. Pronovost P, Needham D, Berenholtz S, et al. An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU. *N Engl J Med* 2006;355(26):2725-2732.

58. Bouadma L, Deslandes E, Lolom I, et al. Long-term impact of a multifaceted prevention program on ventilator-associated pneumonia in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2010;51(10):1115-1122.
59. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, et al. Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg* 1977;186(3):241-250.
60. Papazian L, Fraisse A, Garbe L, et al. Cytomegalovirus. An unexpected cause of ventilator-associated pneumonia. *Anesthesiology* 1996;84(2):280-287.
61. Papazian L, Doddoli C, Chetaille B, et al. A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 2007;35(3):755-762.
62. Luyt CE, Combes A, Deback C, et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007;175(9):935-942.
63. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *Jama* 2008;300(4):413-422.
64. Landelle C, Lepape A, Francais A, et al. Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29(11):1054-1065.
65. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, et al. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 1999;27(5):887-892.
66. Montravers P, Dupont H, Gauzit R, et al. Candida as a risk factor for mortality in peritonitis. *Crit Care Med* 2006;34(3):646-652.
67. Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, et al. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med* 2008;34(2):292-299.
68. Hartemink KJ, Paul MA, Spijkstra JJ, et al. Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis? *Intensive Care Med* 2003;29(11):2068-2071.
69. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, et al. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(6):621-625.
70. Endo Y, Matsushita M, Fujita T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43(5):705-712.
71. Rubino SJ, Selvanantham T, Girardin SE, et al. Nod-like receptors in the control of intestinal inflammation. *Curr Opin Immunol* 2012;24(4):398-404.
72. Ramos HJ, Gale M, Jr. RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Curr Opin Virol* 2011;1(3):167-176.
73. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86(6):973-983.
74. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388(6640):394-397.
75. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998;282(5396):2085-2088.
76. Pene F, Mira JP, Chiche JD. Nobel Prize laureates pave the way for therapeutic advances in sepsis. *Intensive Care Med* 2012;38(2):183-185.
77. Athman R, Philpott D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Opin Microbiol* 2004;7(1):25-32.
78. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5(10):987-995.

79. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006;440(7085):808-812.
80. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13(9):1050-1059.
81. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:297-329.
82. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev* 2007;220:251-269.
83. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005;174(5):2942-2950.
84. McIsaac SM, Stadnyk AW, Lin TJ. Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *J Leukoc Biol* 2012;92(5):977-985.
85. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol* 2012;12(3):168-179.
86. Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009;15(11):1318-1321.
87. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285(5425):248-251.
88. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, et al. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 2008;205(11):2609-2621.
89. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettila V, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clin Chem* 2008;54(6):1000-1007.
90. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464(7285):104-107.
91. Pugin J. Dear SIRS, the concept of "alarmins" makes a lot of sense! *Intensive Care Med* 2008;34(2):218-221.
92. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4(7):499-511.
93. Gangloff M. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends Biochem Sci* 2012;37(3):92-98.
94. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, et al. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 2000;165(12):6682-6686.
95. Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, et al. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* 2004;21(6):877-889.
96. Garlanda C, Anders HJ, Mantovani A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol* 2009;30(9):439-446.
97. Brint EK, Xu D, Liu H, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004;5(4):373-379.
98. Liu J, Buckley JM, Redmond HP, et al. ST2 negatively regulates TLR2 signaling, but is not required for bacterial lipoprotein-induced tolerance. *J Immunol* 2010;184(10):5802-5808.
99. Husebye H, Halaas O, Stenmark H, et al. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* 2006;25(4):683-692.

100. Burns K, Janssens S, Brissoni B, et al. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* 2003;197(2):263-268.
101. Liew FY, Xu D, Brint EK, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005;5(6):446-458.
102. Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 2002;277(9):7059-7065.
103. Toubiana J, Rossi AL, Grimaldi D, et al. IMPDHII protein inhibits Toll-like receptor 2-mediated activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* 2011;286(26):23319-23333.
104. Taveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, et al. Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *N Engl J Med* 1993;328(20):1457-1460.
105. Sultzzer BM, Castagna R, Bandekar J, et al. Lipopolysaccharide nonresponder cells: the C3H/HeJ defect. *Immunobiology* 1993;187(3-5):257-271.
106. Eisenstein TK, Deakins LW, Killar L, et al. Dissociation of innate susceptibility to Salmonella infection and endotoxin responsiveness in C3HeB/FeJ mice and other strains in the C3H lineage. *Infect Immun* 1982;36(2):696-703.
107. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J Immunol* 2000;165(10):5392-5396.
108. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
109. Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology* 2007;212(9-10):715-722.
110. Skerrett SJ, Wilson CB, Liggitt HD, et al. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to Pseudomonas aeruginosa. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292(1):L312-322.
111. Ramphal R, Balloy V, Jyot J, et al. Control of Pseudomonas aeruginosa in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J Immunol* 2008;181(1):586-592.
112. Ramphal R, Balloy V, Huerre M, et al. TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute Pseudomonas aeruginosa lung infections. *J Immunol* 2005;175(6):3927-3934.
113. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, et al. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against Pseudomonas aeruginosa but not Staphylococcus aureus. *J Immunol* 2004;172(6):3377-3381.
114. Gao M, Ha T, Zhang X, et al. Toll-like receptor 3 plays a central role in cardiac dysfunction during polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 2012;40(8):2390-2399.
115. Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, et al. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2008;205(6):1277-1283.
116. Daubeuf B, Mathison J, Spiller S, et al. TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock. *J Immunol* 2007;179(9):6107-6114.
117. Sha T, Iizawa Y, Ii M. Combination of imipenem and TAK-242, a Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis. *Shock* 2011;35(2):205-209.
118. Weighardt H, Kaiser-Moore S, Vabulas RM, et al. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J Immunol* 2002;169(6):2823-2827.

119. Pene F, Courtine E, Ouaz F, et al. Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect Immun* 2009;77(12):5651-5658.
120. Picard C, Puel A, Bonnet M, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003;299(5615):2076-2079.
121. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, et al. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2007;204(10):2407-2422.
122. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 2008;321(5889):691-696.
123. Sancho-Shimizu V, Perez de Diego R, Jouanguy E, et al. Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Curr Opin Virol* 2011;1(6):487-496.
124. Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 2012;13(6):535-542.
125. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 2007;39(4):523-528.
126. Toubiana J, Courtine E, Pene F, et al. IRAK1 functional genetic variant affects severity of septic shock. *Crit Care Med* 2010;38(12):2287-2294.
127. Moreno SE, Alves-Filho JC, Alfaya TM, et al. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Immunol* 2006;177(5):3218-3224.
128. Ohteki T, Tada H, Ishida K, et al. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med* 2006;203(10):2329-2338.
129. Nakano N, Nishiyama C, Kanada S, et al. Involvement of mast cells in IL-12/23 p40 production is essential for survival from polymicrobial infections. *Blood* 2007;109(11):4846-4855.
130. Ebong S, Call D, Nemzek J, et al. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun* 1999;67(12):6603-6610.
131. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996;64(11):4733-4738.
132. Xiao H, Siddiqui J, Remick DG. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect Immun* 2006;74(9):5227-5235.
133. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, et al. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 2006;177(3):1967-1974.
134. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985;229(4716):869-871.
135. Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, et al. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents *Escherichia coli*-induced shock in rabbits. *FASEB J* 1991;5(3):338-343.
136. Remick DG, Call DR, Ebong SJ, et al. Combination immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1 receptor antagonist decreases sepsis mortality. *Crit Care Med* 2001;29(3):473-481.
137. Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, et al. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. *JAMA* 1995;274(2):172-177.
138. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, et al. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000;181(1):176-180.

139. Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, et al. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993;103(2):565-575.
140. Martin C, Boisson C, Haccoun M, et al. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. *Crit Care Med* 1997;25(11):1813-1819.
141. Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996;334(26):1697-1702.
142. Abraham E, Glauser MP, Butler T, et al. p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. Ro 45-2081 Study Group. *JAMA* 1997;277(19):1531-1538.
143. Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* 1997;25(7):1115-1124.
144. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303(5663):1532-1535.
145. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007;13(4):463-469.
146. Cheong C, Matos I, Choi JH, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 2010;143(3):416-429.
147. Janeway CA, Jr. *Immunobiology*; 2012.
148. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-2357.
149. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421(6924):744-748.
150. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198(12):1951-1957.
151. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6(11):1123-1132.
152. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13(2):139-145.
153. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008;9(6):650-657.
154. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8(4):345-350.
155. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006;6(6):476-483.
156. Raja SM, Metkar SS, Froelich CJ. Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Curr Opin Immunol* 2003;15(5):528-532.
157. Stromberg PE, Woolsey CA, Clark AT, et al. CD4+ lymphocytes control gut epithelial apoptosis and mediate survival in sepsis. *FASEB J* 2009;23(6):1817-1825.
158. Martignoni A, Tschop J, Goetzman HS, et al. CD4-expressing cells are early mediators of the innate immune system during sepsis. *Shock* 2008;29(5):591-597.
159. Enoch VT, Lin SH, Etogo A, et al. CD4+ T-cell depletion is not associated with alterations in survival, bacterial clearance, and inflammation after cecal ligation and puncture. *Shock* 2008;29(1):56-64.

160. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999;162(7):4148-4156.
161. Bosmann M, Russkamp NF, Patel VR, et al. The outcome of polymicrobial sepsis is independent of T and B cells. *Shock* 2011;36(4):396-401.
162. Enoh VT, Lin SH, Lin CY, et al. Mice depleted of alphabeta but not gammadelta T cells are resistant to mortality caused by cecal ligation and puncture. *Shock* 2007;27(5):507-519.
163. Kasten KR, Tschop J, Adediran SG, et al. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. *Shock* 2010;34(4):327-336.
164. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, et al. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007;204(2):285-297.
165. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, et al. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 2007;204(2):273-283.
166. Peck A, Mellins ED. Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infect Immun* 2010;78(1):32-38.
167. Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, et al. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 2003;170(4):1958-1963.
168. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 2005;202(6):761-769.
169. Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J Clin Invest* 2009;119(7):1899-1909.
170. Huang W, Na L, Fidel PL, et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004;190(3):624-631.
171. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007;7(11):875-888.
172. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, et al. Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2006;177(11):7943-7949.
173. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, et al. The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care* 2010;14(1):R19.
174. Carrigan SO, Yang YJ, Issekutz T, et al. Depletion of natural CD4+CD25+ T regulatory cells with anti-CD25 antibody does not change the course of *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung infection in mice. *Immunobiology* 2009;214(3):211-222.
175. Sherwood ER, Enoh VT, Murphey ED, et al. Mice depleted of CD8+ T and NK cells are resistant to injury caused by cecal ligation and puncture. *Lab Invest* 2004;84(12):1655-1665.
176. Wesche-Soldato DE, Chung CS, Gregory SH, et al. CD8+ T cells promote inflammation and apoptosis in the liver after sepsis: role of Fas-FasL. *Am J Pathol* 2007;171(1):87-96.
177. Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J Exp Med* 2011;208(8):1673-1682.
178. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137(5):1142-1162.
179. Fogg DK, Sibon C, Miled C, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006;311(5757):83-87.

180. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000;95(11):3489-3497.
181. Maraskovsky E, Daro E, Roux E, et al. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 2000;96(3):878-884.
182. Gilliet M, Boonstra A, Paturel C, et al. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 2002;195(7):953-958.
183. Liu K, Waskow C, Liu X, et al. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* 2007;8(6):578-583.
184. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005;175(3):1373-1381.
185. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7(1):19-30.
186. Kamath AT, Henri S, Battye F, et al. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 2002;100(5):1734-1741.
187. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19(1):71-82.
188. Krutzik SR, Tan B, Li H, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 2005;11(6):653-660.
189. Buettner M, Meinken C, Bastian M, et al. Inverse correlation of maturity and antibacterial activity in human dendritic cells. *J Immunol* 2005;174(7):4203-4209.
190. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2(3):151-161.
191. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001;194(6):769-779.
192. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179(4):1109-1118.
193. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med* 1997;185(2):317-328.
194. Roake JA, Rao AS, Morris PJ, et al. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med* 1995;181(6):2237-2247.
195. Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, et al. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 2001;166(6):3837-3845.
196. Martinez D, Vermeulen M, von Euw E, et al. Extracellular acidosis triggers the maturation of human dendritic cells and the production of IL-12. *J Immunol* 2007;179(3):1950-1959.
197. Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, et al. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood* 2007;110(13):4293-4302.
198. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002;195(11):1507-1512.
199. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, et al. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 2001;167(9):5067-5076.

200. van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007;27(4):660-669.
201. Caparros E, Munoz P, Sierra-Filardi E, et al. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* 2006;107(10):3950-3958.
202. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007;7(3):179-190.
203. Steinhauser ML, Hogaboam CM, Lukacs NW, et al. Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *J Immunol* 1999;162(9):5437-5443.
204. Scumpia PO, McAuliffe PF, O'Malley KA, et al. CD11c+ dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2005;175(5):3282-3286.
205. Schindler D, Gutierrez MG, Beineke A, et al. Dendritic cells are central coordinators of the host immune response to *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Am J Pathol* 2012;181(4):1327-1337.
206. Bendelac A, Bonneville M, Kearney JF. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2001;1(3):177-186.
207. Kearney JF. Innate-like B cells. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26(4):377-383.
208. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, et al. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 2005;23(1):7-18.
209. Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, et al. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* 2012;335(6068):597-601.
210. Konigshofer Y, Chien YH. Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes? *Curr Opin Immunol* 2006;18(5):527-533.
211. Martin B, Hirota K, Cua DJ, et al. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 2009;31(2):321-330.
212. Andrew EM, Carding SR. Murine gammadelta T cells in infections: beneficial or deleterious? *Microbes Infect* 2005;7(3):529-536.
213. Chodaczek G, Papanna V, Zal MA, et al. Body-barrier surveillance by epidermal gammadelta TCRs. *Nat Immunol* 2012;13(3):272-282.
214. Venet F, Bohe J, Debard AL, et al. Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med* 2005;33(12):2836-2840.
215. Venet F, Chung CS, Monneret G, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol* 2008;83(3):523-535.
216. Jameson J, Havran WL. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 2007;215:114-122.
217. Brigl M, Brenner MB. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin Immunol* 2010;22(2):79-86.
218. Mattner J, Debord KL, Ismail N, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 2005;434(7032):525-529.
219. Kinjo Y, Wu D, Kim G, et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 2005;434(7032):520-525.
220. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 2006;7(9):978-986.
221. Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, et al. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* 2011;12(10):966-974.
222. Leung B, Harris HW. NKT cells in sepsis. *Clin Dev Immunol* 2010;2010.

223. Treiner E, Lantz O. CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Curr Opin Immunol* 2006;18(5):519-526.
224. Treiner E, Duban L, Moura IC, et al. Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells: an evolutionarily conserved T cell subset. *Microbes Infect* 2005;7(3):552-559.
225. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 2011;117(4):1250-1259.
226. Le Bourhis L, Guerri L, Dusseaux M, et al. Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol* 2011;32(5):212-218.
227. Le Bourhis L, Martin E, Peguillet I, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* 2010;11(8):701-708.
228. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 2012;491(7426):717-723.
229. Georgel P, Radosavljevic M, Macquin C, et al. The non-conventional MHC class I MR1 molecule controls infection by *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Mol Immunol* 2011;48(5):769-775.
230. Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, et al. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol* 2010;8(6):e1000407.
231. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005;365(9453):63-78.
232. Franco RF, de Jonge E, Dekkers PE, et al. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood* 2000;96(2):554-559.
233. Moine P, Abraham E. Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock* 2004;22(4):297-308.
234. Ader F, Le Berre R, Faure K, et al. Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. *Infect Immun* 2005;73(7):4263-4271.
235. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999;104(6):743-750.
236. El Solh AA, Akinnusi ME, Wiener-Kronish JP, et al. Persistent infection with *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008;178(5):513-519.
237. Francois B, Luyt CE, Dugard A, et al. Safety and pharmacokinetics of an anti-PcrV PEGylated monoclonal antibody fragment in mechanically ventilated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Crit Care Med* 2012;40(8):2320-2326.
238. Lappin E, Ferguson AJ. Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect Dis* 2009;9(5):281-290.
239. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006;355(10):1018-1028.
240. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;163(2):316-321.
241. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 2011;208(13):2581-2590.
242. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24(7):1125-1128.
243. Reddy RC, Chen GH, Newstead MW, et al. Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun* 2001;69(3):1394-1401.
244. Song GY, Chung CS, Chaudry IH, et al. What is the role of interleukin 10 in polymicrobial sepsis: anti-inflammatory agent or immunosuppressant? *Surgery* 1999;126(2):378-383.

245. Ayala A, Chung CS, Song GY, et al. IL-10 mediation of activation-induced TH1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis. *Cytokine* 2001;14(1):37-48.
246. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008;180(9):5771-5777.
247. Ashare A, Powers LS, Butler NS, et al. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288(4):L633-640.
248. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, et al. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 1998;351(9107):950-953.
249. Caille V, Chiche JD, Nciri N, et al. Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock* 2004;22(6):521-526.
250. Monneret G, Finck ME, Venet F, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 2004;95(2):193-198.
251. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, et al. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004;169(10):1144-1151.
252. Pangault C, Le Tulzo Y, Tattevin P, et al. Down-modulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on monocytes during human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34(4):1193-1201.
253. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;166(11):1475-1482.
254. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, et al. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 2000;96(1):218-223.
255. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 1995;85(5):1341-1347.
256. Adib-Conquy M, Moine P, Asehnoune K, et al. Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003;168(2):158-164.
257. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, et al. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* 1998;102(9):1645-1652.
258. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000;162(5):1877-1883.
259. Escoll P, del Fresno C, Garcia L, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311(2):465-472.
260. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, et al. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med* 2006;34(9):2377-2385.
261. O'Neill LA. TAMpering with toll-like receptor signaling. *Cell* 2007;131(6):1039-1041.
262. Guignant C, Venet F, Planel S, et al. Increased MerTK expression in circulating innate immune cells of patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2013;39(9):1556-1564.
263. Pachot A, Cazalis MA, Venet F, et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol* 2008;180(9):6421-6429.

264. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3(6):678-681.
265. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, et al. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med* 2002;30(5):1015-1023.
266. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32(8):1175-1183.
267. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock* 2010;34 Suppl 1:15-21.
268. Schultz MJ, Olszyna DP, de Jonge E, et al. Reduced ex vivo chemokine production by polymorphonuclear cells after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. *J Infect Dis* 2000;182(4):1264-1267.
269. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, et al. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 2004;30(4):605-611.
270. Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med* 2002;30(5):1056-1061.
271. Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, et al. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(10):4018-4023.
272. Freitas A, Alves-Filho JC, Victoni T, et al. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2009;182(12):7846-7854.
273. Steinhäuser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, et al. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 1999;162(1):392-399.
274. Chen GH, Reddy RC, Newstead MW, et al. Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. *J Immunol* 2000;165(11):6496-6503.
275. Delano MJ, Thayer T, Gabrilovich S, et al. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J Immunol* 2011;186(1):195-202.
276. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, et al. Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol* 2003;171(2):909-914.
277. Ding Y, Chung CS, Newton S, et al. Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice. *Shock* 2004;22(2):137-144.
278. Efron PA, Martins A, Minnich D, et al. Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2004;173(5):3035-3043.
279. Wen H, Dou Y, Hogaboam CM, et al. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood* 2008;111(4):1797-1804.
280. Pastille E, Didovic S, Brauckmann D, et al. Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2011;186(2):977-986.
281. Flohe SB, Agrawal H, Schmitz D, et al. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol* 2006;79(3):473-481.

282. Pene F, Zuber B, Courtine E, et al. Dendritic Cells Modulate Lung Response to *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Model of Sepsis-Induced Immune Dysfunction. *J Immunol* 2008;181(12):8513-8520.
283. Fujita S, Seino K, Sato K, et al. Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood* 2006;107(9):3656-3664.
284. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002;168(5):2493-2500.
285. Hosmalin A, Lichtner M, Louis S. Clinical analysis of dendritic cell subsets: the dendritogram. *Methods Mol Biol* 2008;415:273-290.
286. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiebaut R, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med* 2007;33(1):148-152.
287. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, et al. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* 2009;13(4):R119.
288. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27(7):1230-1251.
289. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001;166(11):6952-6963.
290. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002;18(6):487-494.
291. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000;1(6):496-501.
292. Shelley O, Murphy T, Paterson H, et al. Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 2003;20(2):123-129.
293. Reim D, Westenfelder K, Kaiser-Moore S, et al. Role of T Cells for Cytokine Production and Outcome in a Model of Acute Septic Peritonitis. *Shock* 2008.
294. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006;6(11):813-822.
295. Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 2004;32(11):2329-2331.
296. Wisnoski N, Chung CS, Chen Y, et al. The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock* 2007;27(3):251-257.
297. Kushwah R, Oliver JR, Zhang J, et al. Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol* 2009;183(11):7104-7118.
298. Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009;35(4):678-686.
299. Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sonogo F, et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med* 2010;38(8):1718-1725.
300. Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, et al. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(11):6724-6729.
301. Albert ML. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? *Nat Rev Immunol* 2004;4(3):223-231.

302. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, et al. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 1995;222(4):482-490; discussion 490-482.
303. Lyons A, Kelly JL, Rodrick ML, et al. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann Surg* 1997;226(4):450-458; discussion 458-460.
304. Spolarics Z, Siddiqi M, Siegel JH, et al. Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. *Crit Care Med* 2003;31(6):1722-1729.
305. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, et al. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol* 2008;180(10):6941-6946.
306. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011;306(23):2594-2605.
307. Guignant C, Lepape A, Huang X, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care* 2011;15(2):R99.
308. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 2007;204(6):1463-1474.
309. Varma TK, Durham M, Murphey ED, et al. Endotoxin priming improves clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in wild-type and interleukin-10 knockout mice. *Infect Immun* 2005;73(11):7340-7347.
310. Murphey ED, Fang G, Sherwood ER. Endotoxin pretreatment improves bacterial clearance and decreases mortality in mice challenged with *Staphylococcus aureus*. *Shock* 2008;29(4):512-518.
311. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011;19(4):198-208.
312. Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, et al. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock* 2006;26(6):565-570.
313. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J Clin Invest* 2006;116(9):2532-2542.
314. Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, et al. Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol* 2003;163(6):2605-2617.
315. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, et al. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* 2005;105(9):3588-3595.
316. Wen H, Hogaboam CM, Gauldie J, et al. Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile. *Am J Pathol* 2006;168(6):1940-1950.
317. Unsinger J, Burnham CA, McDonough J, et al. Interleukin-7 ameliorates immune dysfunction and improves survival in a 2-hit model of fungal sepsis. *J Infect Dis* 2012;206(4):606-616.
318. Jung E, Perrone EE, Liang Z, et al. Cecal ligation and puncture followed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia increases mortality in mice and blunts production of local and systemic cytokines. *Shock* 2012;37(1):85-94.
319. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, et al. Deletion of MyD88 markedly attenuates sepsis-induced T and B lymphocyte apoptosis but worsens survival. *J Leukoc Biol* 2008;83(4):1009-1018.

320. Hoogerwerf JJ, Leendertse M, Wieland CW, et al. Loss of suppression of tumorigenicity 2 (ST2) gene reverses sepsis-induced inhibition of lung host defense in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(7):932-940.
321. D'Arpa N, Accardo-Palumbo A, Amato G, et al. Circulating dendritic cells following burn. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2009;35(4):513-518.
322. Perbet S, Mongardon N, Dumas F, et al. Early-onset pneumonia after cardiac arrest: characteristics, risk factors and influence on prognosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;184(9):1048-1054.
323. Grimaldi D, Guivarch E, Neveux N, et al. Markers of intestinal injury are associated with endotoxemia in successfully resuscitated patients. *Resuscitation* 2012.
324. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, et al. Modulation of the Bcl-2 Family Blocks Sepsis-Induced Depletion of Dendritic Cells and Macrophages. *Shock* 2008.
325. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8(8):594-606.
326. Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, et al. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood* 2007;109(4):1574-1583.
327. Faure K, Sawa T, Ajayi T, et al. TLR4 signaling is essential for survival in acute lung injury induced by virulent *Pseudomonas aeruginosa* secreting type III secretory toxins. *Respir Res* 2004;5:1.
328. Asehnoune K, Roquilly A, Abraham E. Innate immune dysfunction in trauma patients: from pathophysiology to treatment. *Anesthesiology* 2012;117(2):411-416.
329. Kawasaki T, Fujimi S, Lederer JA, et al. Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice. *J Immunol* 2006;177(7):4514-4520.
330. Roquilly A, Gautreau L, Segain JP, et al. CpG-ODN and MPLA prevent mortality in a murine model of post-hemorrhage-*Staphylococcus aureus* pneumonia. *PLoS One* 2010;5(10):e13228.
331. Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med* 2009;37(1 Suppl):S30-37.
332. Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, et al. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol* 2004;76(2):291-299.
333. Turnbull IR, Wlzonek JJ, Osborne D, et al. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock* 2003;19(4):310-313.
334. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(9):3507-3512.
335. Horneff MW, Wick MJ, Rhen M, et al. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2002;3(11):1033-1040.
336. Casadevall A, Fang FC, Pirofski LA. Microbial virulence as an emergent property: consequences and opportunities. *PLoS Pathog* 2011;7(7):e1002136.
337. Pirofski LAC, A. The Damage-Response Framework of Microbial Pathogenesis and Infectious Diseases. In: *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*: Landes Bioscience and Springer Science; 2008.
338. Casadevall A, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2003;1(1):17-24.
339. Grimaldi D, Bonacorsi S, Roussel H, et al. Unusual "flesh-eating" strain of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2010;48(10):3794-3796.
340. Venet F, Lukaszewicz AC, Payen D, et al. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 2013;25(4):477-483.

341. Pene F, Courtine E, Cariou A, et al. Toward theragnostics. *Crit Care Med* 2009;37(1 Suppl):S50-58.
342. Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, et al. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol* 2010;184(7):3768-3779.
343. Venet F, Foray AP, Villars-Mechin A, et al. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol* 2012;189(10):5073-5081.
344. Wysocka M, Montaner LJ, Karp CL. Flt3 ligand treatment reverses endotoxin tolerance-related immunoparalysis. *J Immunol* 2005;174(11):7398-7402.
345. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J Biol Chem* 2002;277(31):27927-27934.
346. Leentjens J, Kox M, Koch RM, et al. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(9):838-845.
347. Flohe S, Lendemans S, Selbach C, et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma. *Crit Care Med* 2003;31(10):2462-2469.
348. Nierhaus A, Montag B, Timmler N, et al. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2003;29(4):646-651.
349. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009;180(7):640-648.

ANNEXE

L'immunodépression post-infectieuse, réalité clinique et données expérimentales

D Grimaldi, F. Pène,
Réanimation 2012 ; 17 : 379-86

Quand et comment décèdent les patients admis pour choc septique en réanimation ?

D Grimaldi, F Daviaud, J Charpentier, A Bouglé, JD Chiche, A Cariou, JP Mira,
F Pène
Résumé 41^e congrès de la SRLF Paris 2013

Immunodépression induite par le sepsis: réalité clinique et données expérimentales

Sepsis-induced immune suppression: clinical evidence and experimental data

D. Grimaldi · F. Pène

Reçu le 29 novembre 2011 ; accepté le 7 février 2012
© SRLF et Springer-Verlag France 2012

Résumé La majorité des patients septiques actuellement pris en charge en réanimation survivent à l'agression initiale, mais présentent une susceptibilité particulière aux infections nosocomiales. En plus des facteurs de risque classiques d'infection nosocomiale, des dysfonctions immunitaires acquises altèrent les défenses du patient septique. En effet, le sepsis induit des anomalies quantitatives et fonctionnelles des cellules de l'immunité innée et adaptative, incluant une désactivation des monocytes, un défaut de migration des polynucléaires neutrophiles, une apoptose des cellules dendritiques associée à un défaut de production d'interleukine-12, une apoptose des lymphocytes T et B et une expansion des lymphocytes T régulateurs. Ces anomalies aboutissent à une immunodépression post-infectieuse complexe. Des modèles animaux pertinents ont permis de démontrer formellement l'impact du sepsis sur les défenses de l'hôte envers une agression infectieuse secondaire, et permettent d'approcher les déterminants cellulaires et moléculaires qui régulent ces phénomènes.

Mots clés : Immunodépression · Sepsis · Réanimation · Infections nosocomiales · Cellules dendritiques · Récepteurs Toll

Abstract A majority of patients with severe sepsis and septic shock survive the primary injury, but are particularly prone to develop intensive care unit-acquired infections. In addition to classical risk factors of hospital-acquired infections, some acquired immune dysfunctions may impair septic hosts' defence. Indeed, sepsis induces quantitative and func-

tional defects of innate and adaptive immune cells, including monocyte deactivation, defective migration of neutrophils, apoptosis of dendritic cells, impaired production of interleukin-12, apoptosis of T and B lymphocytes, and expansion of regulatory T cells, resulting in a complex post-infective immune dysfunction. Relevant animal models allowed to demonstrate the impact of sepsis on host defence towards secondary infectious insults, and provided insights into cellular and molecular mechanisms that regulate these phenomena.

Keywords: Immune suppression · sepsis · Intensive care unit acquired infections · Dendritic cells · Toll-like receptors

Introduction

Dans la conception classique de la physiopathologie du sepsis, la réaction inflammatoire déclenchée par le pathogène est considérée comme la principale responsable des défaillances d'organes et de la mortalité. Grâce aux progrès thérapeutiques, la majorité des patients septiques actuellement pris en charge en réanimation survivent à l'agression initiale. En revanche, ces patients présentent une susceptibilité particulière aux infections nosocomiales qui grèvent significativement leur pronostic. Au-delà des facteurs de risque classiques liés aux soins, aux comorbidités et à la sévérité de l'affection aiguë, des dysfonctions immunitaires acquises pourraient altérer les défenses anti-infectieuses du patient septique. En effet, le sepsis induit des anomalies quantitatives et fonctionnelles des cellules de l'immunité innée et adaptative, qui aboutissent à une immunodépression post-infectieuse complexe [1]. Ces dernières années, des progrès dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de ces phénomènes ont été réalisés grâce à des études translationnelles chez des patients septiques et au

D. Grimaldi · F. Pène (✉)

Service de réanimation médicale, hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, F-75014 Paris
e-mail : frederic.pene@cch.aphp.fr

Université Paris Descartes et Sorbonne Paris Cité

Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR-8104, Paris

développement de modèles animaux mimant des situations cliniques fréquemment rencontrées en réanimation.

Manifestations cliniques d'immunodépression chez les patients septiques

Plusieurs observations suggèrent que certains patients septiques considérés comme immunocompétents présentent fréquemment des manifestations cliniques témoignant d'une immunodépression acquise, telles qu'une anergie cutanée à des antigènes communs témoignant d'un défaut d'hypersensibilité retardée [2] ou la réactivation de virus latents du groupe *Herpes* (cytomégalo virus [CMV] et herpes simplex virus [HSV]) [3,4]. Dans une étude prospective multicentrique portant sur 120 patients immunocompétents hospitalisés en réanimation, le taux de réactivation du CMV était de 33 % avec un délai médian de 12 jours (extrêmes 3-57 jours). De plus, la réactivation CMV était un facteur pronostique indépendant associé à la mortalité [3]. La réactivation du CMV pourrait ainsi constituer un marqueur robuste d'immunosuppression acquise en réanimation. En outre, ce virus à tropisme leucocytaire possède des propriétés immunomodulatrices subversives, et pourrait ainsi jouer un rôle actif dans l'acquisition des dysfonctions immunitaires.

Les principales complications infectieuses observées chez les patients de réanimation et chez les patients septiques en particulier demeurent les infections bactériennes et en particulier les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) qui représentent la première cause d'infection nosocomiale en réanimation. Chez le patient intubé et ventilé, la perte des défenses mécaniques pulmonaires de l'hôte et la suppression de la flore normale au profit de bactéries nosocomiales représentent des étapes-clés dans la survenue des PAVM. La plupart des facteurs de risque de PAVM favorisent directement ou indirectement ces mécanismes et sont liés aux comorbidités sous-jacentes, à la sévérité de la pathologie aiguë, à l'atteinte structurale du poumon et à la colonisation bactérienne des voies aériennes [5]. Au-delà de ces facteurs communs aux patients ventilés mécaniquement, le risque de PAVM semble particulièrement marqué chez les patients dans les suites d'un choc septique. Dans une étude rétrospective comparant 200 patients admis pour choc septique à plus de 800 patients admis en réanimation pour un autre motif, la présence d'un choc septique était indépendamment associée à la survenue d'une PAVM [6]. Ainsi, des mécanismes physiopathologiques spécifiques pourraient altérer les défenses pulmonaires de l'hôte septique et favoriser le développement de PAVM. Par ailleurs, il apparaît maintenant clairement que les patients septiques de réanimation considérés comme immunocompétents ont une susceptibilité accrue aux infections fongiques invasives, dont les candidoses sont de loin les plus fréquentes [7]. En outre,

des cas d'aspergillose pulmonaire invasive, infection opportuniste touchant habituellement des patients sévèrement immunodéprimés, ont été rapportés chez des patients septiques en l'absence de facteurs classiques d'immunodépression, suggérant une altération acquise et profonde des fonctions phagocytaires et lymphocytaires [8,9].

Le sepsis sévère apparaît donc comme une situation caractéristique d'immunodépression acquise en réanimation. La variété des complications infectieuses observées dans ce contexte suggère un déficit immunitaire complexe affectant les cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

Dysfonctions immunitaires induites par le sepsis

De nombreuses études humaines et animales ont permis de préciser les modifications complexes du système immunitaire induites par les infections graves, qui touchent à la fois des composants de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Fig. 1). Pour des raisons méthodologiques évidentes, la grande majorité des études humaines n'ont évalué que les modifications immunitaires du compartiment sanguin. Cependant quelques études essentiellement autopsiques ont permis d'approcher les atteintes tissulaires au sein des organes lymphoïdes secondaires. Ces limites ont rendu nécessaire l'utilisation de modèles animaux d'infections sévères, qui ont pour avantage le contrôle des caractéristiques de l'hôte et de la charge infectieuse et la reproductibilité. Le modèle de sepsis le plus couramment utilisé dans la littérature est une péritonite polymicrobienne induit par ligature et ponction caecale (LPC) chez la souris. Ce modèle a permis une exploration approfondie des conséquences du sepsis sur les cellules du système immunitaire au sein des tissus infectés et des organes lymphoïdes secondaires.

Réponse anti-inflammatoire systémique

Lors de l'invasion bactérienne, l'organe infecté est le siège d'une réaction inflammatoire intense qui a pour but d'éradiquer le pathogène et de limiter les dommages tissulaires. Le paradigme classique du sepsis découle de la perte de la compartimentalisation de ce phénomène local qui peut aboutir à une réponse inflammatoire systémique et à des dysfonctions d'organes non infectés. À cette réponse inflammatoire systémique s'associe rapidement une réponse anti-inflammatoire soutenue. La réponse anti-inflammatoire systémique se caractérise par la synthèse de médiateurs anti-inflammatoires, dont l'interleukine (IL)-10, et des inhibiteurs de cytokines pro-inflammatoires comme le récepteur soluble du facteur nécrosant de tumeur (TNF) TNF- α ou le récepteur antagoniste de l'IL-1. L'IL-10 représente la cytokine anti-inflammatoire prototypique douée d'effets

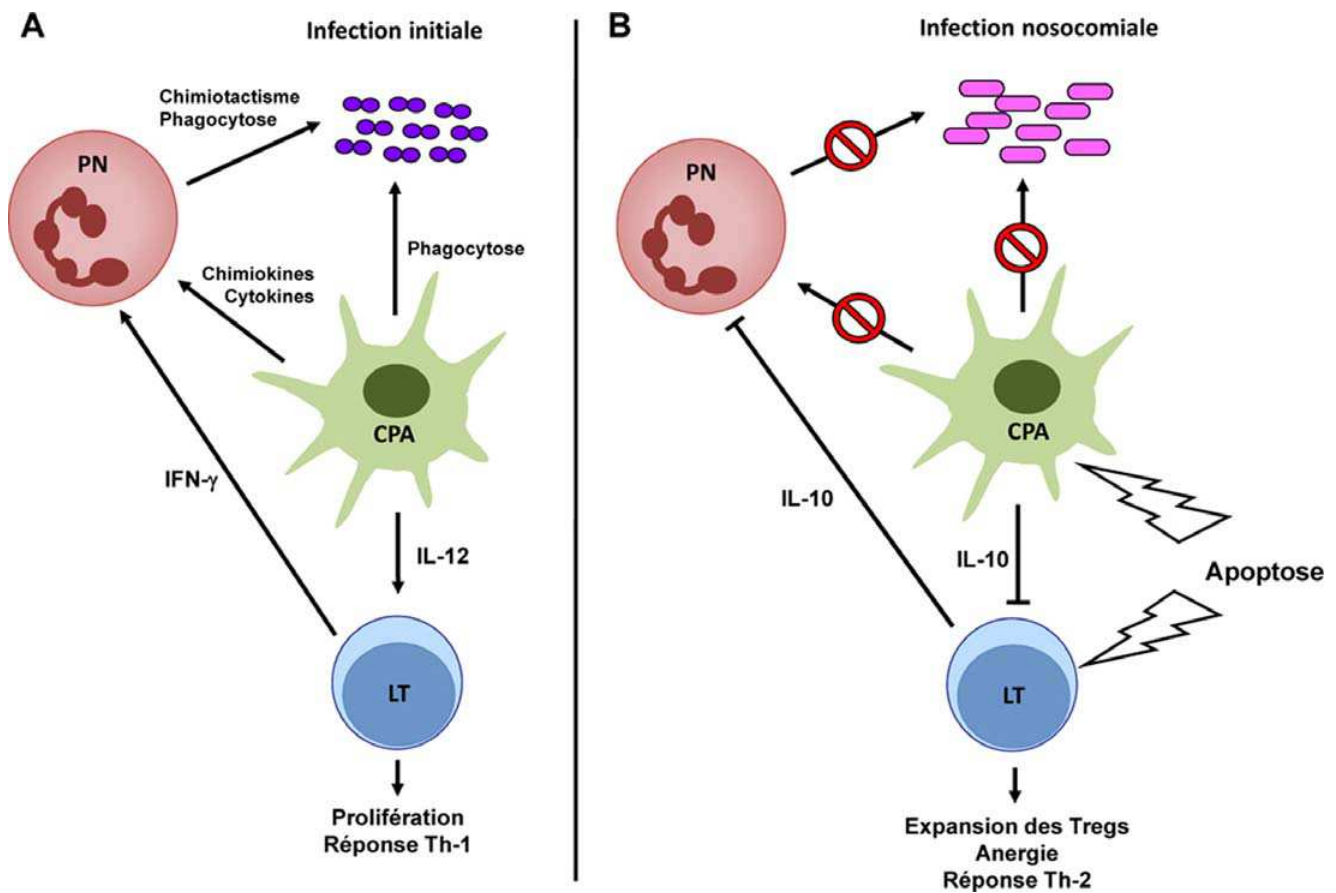


Fig. 1 Dysfonctions immunitaires de l'hôte septique au cours des infections secondaires. **A.** L'invasion tissulaire par une bactérie (infection initiale) est détectée par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), monocytes/macrophages et cellules dendritiques (CDs). Celle-ci initie la réponse immunitaire innée par la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires, qui aboutit au recrutement et à l'activation des polynucléaires neutrophiles (PN) au site infecté. La reconnaissance de la bactérie entraîne parallèlement un processus de maturation des CPA caractérisé par une augmentation d'expression de l'appareil de présentation de l'antigène (CMH II, CD40, CD86). Les trois signaux délivrés par la CPA (présentation de l'antigène au TCR par le CMHII, costimulation par les molécules CD40 et CD86 et production de la cytokine immunostimulante IL-12) provoquent l'activation et la prolifération des lymphocytes T (LT) CD4⁺, ainsi qu'une réponse cytokinique de type Th-1 (IFN- γ) qui stimule les fonctions des cellules phagocytaires. **B.** En phase post-septique, la réponse de l'hôte à une infection secondaire est déficiente à plusieurs niveaux. Les cellules immunitaires présentent de profondes anomalies quantitatives et fonctionnelles qui altèrent les mécanismes de clairance du pathogène. Les PN présentent un défaut de migration au site infecté. L'apoptose des CDs et des lymphocytes T favorise une réponse immunitaire tolérogène. Les CPA restantes présentent des anomalies de maturation caractérisée par une diminution d'expression de l'appareil de présentation de l'antigène, associée à une diminution de la production de médiateurs pro-inflammatoires au profit de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. La réponse T résultante est caractérisée par une expansion des lymphocytes T régulateurs (Tregs), une anergie et une polarisation cytokinique anti-inflammatoire de type Th-2

pléiotropiques sur les cellules immunitaires. Elle inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, la maturation des cellules dendritiques (CDs), oriente la réponse lymphocytaire vers un profil cytokinique de type Th-2 et induit des sous-populations régulatrices de lymphocytes T. Au cours des infections, l'IL-10 permettrait ainsi de prévenir les lésions tissulaires de l'hôte, mais parfois au prix d'une altération des mécanismes d'éradication du pathogène. Chez les patients septiques, les concentrations de médiateurs anti-

inflammatoires sont élevées dès l'admission à l'hôpital et l'amplitude de la production d'IL-10 est corrélée à la sévérité et à la mortalité du sepsis [10,11]. Dans les modèles animaux de sepsis caractérisés par une induction programmée de l'infection, la production des médiateurs anti-inflammatoires survient secondairement (12-24 heures) par rapport au pic de concentration sérique des cytokines pro-inflammatoires (2-6 heures) et dure plusieurs jours [12,13].

Désactivation des monocytes

Les monocytes représentent les précurseurs des macrophages tissulaires et des CD inflammatoires. Ils jouent ainsi un rôle majeur dans la réponse innée à l'invasion de microorganismes. Les fonctions des monocytes incluent la phagocytose des pathogènes, la présentation des antigènes par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), ainsi que la production de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance. Au cours du sepsis, les monocytes subissent une désactivation dont l'anomalie la plus caractéristique est la diminution d'expression membranaire de HLA-DR. Celle-ci a été rapportée à divers mécanismes incluant une régulation transcriptionnelle négative par le cortisol [14], une diminution de l'expression du récepteur membranaire au *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) [15] ou la séquestration intracytoplasmique de HLA-DR induite par l'IL-10 [16]. La diminution d'expression de l'appareil de présentation de l'antigène à la surface des monocytes a des conséquences fonctionnelles directes sur les lymphocytes T en favorisant une réponse de type anergique ou régulatrice. En parallèle, les monocytes provenant de patients septiques démontrent une altération de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à une stimulation *in vitro* par du lipopolysaccharide (LPS) [17] alors que la production d'IL-10 est maintenue ou augmentée [18]. La régulation de ces phénomènes implique le recrutement préférentiel de la forme homodimérique inhibitrice p50p50 du facteur de transcription NF- κ B [19] ou l'expression de régulateurs négatifs (IRAK-M, MyD88s, SIGIRR) des voies de signalisation dépendantes du récepteur au LPS *Toll-like Receptor* (TLR)-4 [20,21]. En outre, le sepsis entraîne une diminution d'expression du récepteur de chimiokine CX3CR1 impliqué dans les phénomènes d'adhésion et de recrutement tissulaire, ainsi qu'une surexpression des molécules inhibitrices de type PD-1 (*Programmed Death-1*) [22,23]. La désactivation monocytaire apparaît ainsi comme un mécanisme rapidement opérationnel de régulation négative de la réaction inflammatoire au cours des états infectieux sévères.

La diminution de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes est facilement mesurable en cytométrie de flux. Elle a été documentée dans les états septiques sévères par de nombreuses études humaines [14,24-27]. L'amplitude et la durée de la diminution d'expression de HLA-DR ont été corrélées au nombre et à l'intensité des défaillances d'organes. De plus, la persistance d'une faible expression de HLA-DR (<30 % des monocytes) a été identifiée comme un facteur pronostique de mortalité et comme un facteur de risque d'infections nosocomiales [25,27]. La désactivation des monocytes évaluée par l'expression de la molécule HLA-DR constitue ainsi à l'heure actuelle un marqueur robuste

d'immunodépression induite par le sepsis chez les patients de réanimation.

Défaut de migration des polynucléaires neutrophiles

À l'instar des monocytes, les polynucléaires neutrophiles (PN) subissent des modifications fonctionnelles qui peuvent participer à une susceptibilité accrue aux infections secondaires au cours du sepsis. Le sepsis semble principalement affecter les capacités de migration tissulaire des PN, en rapport avec une diminution d'expression membranaire du récepteur de chimiokine CXCR-2 [28]. L'altération du chimiotactisme des PN est un facteur de surmortalité chez l'animal et a été corrélée à la mortalité des patients septiques [29]. De manière intéressante, l'altération de clairance bactérienne caractéristique de certains modèles de pneumonies secondaires chez des animaux septiques a été rapportée à un défaut de recrutement pulmonaire des PN [30-32].

Apoptose et anomalies fonctionnelles des cellules dendritiques

Les CD sont des cellules spécialisées dans la capture et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T. L'initiation et l'orientation de la réponse lymphocytaire dépendent de l'intégration par le lymphocyte T de trois signaux issus de la CD : la présentation de l'antigène, l'expression des molécules de costimulation CD40 et CD86 et la production de cytokines. Ce processus est dépendant de l'état de maturation des CD sous l'influence de stimuli infectieux ou inflammatoires. Les CD jouent ainsi un rôle unique à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative.

Plusieurs travaux récents, essentiellement réalisés chez la souris, mais qui semblent corroborés par des études humaines, ont rapporté une déplétion précoce des CD associée à des anomalies fonctionnelles des cellules résiduelles au cours des différentes phases du sepsis. Chez la souris, le sepsis polymicrobien induit une apoptose des CD au sein des organes lymphoïdes secondaires [33,34], ainsi que dans les organes situés à distance du foyer infectieux initial [35]. La fonction des CD est aussi durablement affectée, y compris après repopulation des organes lymphoïdes secondaires. Les CD isolées de souris septiques démontrent ainsi une altération prolongée de production d'IL-12 en rapport avec des modifications épigénétiques alors que la production d'IL-10 est maintenue, voire augmentée [35]. Ceci s'accompagne d'une baisse d'expression des molécules du CMH II et de costimulation responsable d'une diminution des capacités de stimulation des lymphocytes T [36]. Ce phénotype se rapproche ainsi de celui de CD dites régulatrices car induisant préférentiellement l'expansion de lymphocytes T anergiques ou régulateurs [37].

Chez l'homme, l'étude des CD est limitée par leur localisation majoritairement tissulaire. Cependant, une étude anatomopathologique a rapporté une déplétion des CD dans la rate de patients septiques mais pas dans des rates obtenues par splénectomie pour traumatisme splénique [38]. Dans le sang, les CD représentent une fraction minime (0,2 à 0,5 %) des leucocytes, mais dont la quantification est récemment devenue possible grâce aux progrès de la cytométrie en flux. Au cours du choc septique, il existe une diminution profonde et durable des CD circulantes [39-41]. Les CD résiduelles sont caractérisées par une diminution de l'expression membranaire de HLA-DR similaire à celle observée chez les monocytes. De façon intéressante, l'absence d'augmentation des CD circulantes au septième jour a été associée à la survenue d'infections nosocomiales [41].

Apoptose des lymphocytes T et B et expansion des lymphocytes T régulateurs

La survenue d'une apoptose lymphocytaire est une manifestation immunopathologique caractéristique du sepsis. L'apoptose des lymphocytes T et B a été observée dans la rate de patients septiques et est reflétée par une lymphopénie dont la profondeur est corrélée à la sévérité des défaillances d'organes et dont la persistance est associée au décès [42,43]. Les conséquences de l'apoptose lymphocytaire sont multiples. Les lymphocytes contribuent de manière précoce à la réaction inflammatoire et à la clairance bactérienne. De nombreuses stratégies visant à inhiber l'apoptose lymphocytaire ont été associées à une amélioration de la survie chez des souris soumises à un sepsis polymicrobien. Parmi ces stratégies, citons la surexpression lymphocytaire de protéines anti-apoptotiques, l'hyperactivation de NF- κ B dans les lymphocytes T, la neutralisation de protéines ou d'effecteurs (caspases) pro-apoptotiques, l'administration de substances favorisant la survie cellulaire telle que l'IL-7 ou l'IL-15 ou encore l'expression intrathymique d'IL-10 par le biais d'un vecteur adénoviral [44]. En outre, l'apoptose joue par elle-même un rôle immunomodulateur essentiel. Dans un travail remarquable, Hotchkiss et al. ont mis en évidence les rôles respectifs de l'apoptose et de la nécrose sur la modulation de la réponse immunitaire au cours du sepsis polymicrobien murin. Ainsi, le transfert de cellules apoptotiques (splénocytes irradiés) est associé à une diminution de la production d'interféron (IFN)- γ par des splénocytes de l'hôte et à une diminution de la survie. À l'inverse, le transfert de cellules nécrotiques (splénocytes congelés puis décongelés) permet d'augmenter la production d'IFN- γ , augmente la clairance bactérienne et finalement améliore la survie des animaux [45].

Enfin, l'apoptose induite par le sepsis modifie profondément la répartition des sous-populations lymphocytaires. En raison d'une déplétion préférentielle des lymphocytes CD4

⁺CD25⁺, la proportion relative des lymphocytes T régulateurs (Tregs) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ à potentiel immunosuppresseur augmente au cours du choc septique chez l'homme [46-48]. En revanche, le nombre total de Tregs est inchangé ou modérément diminué par rapport à des sujets contrôles. Dans les modèles animaux de sepsis, il existe une expansion des Tregs au sein des organes lymphoïdes secondaires [48-50]. Les mécanismes expliquant la préservation des Tregs au cours du sepsis sont complexes et incluent une résistance à l'apoptose ainsi qu'une induction de Tregs par des CD ayant acquis un phénotype régulateur sous l'influence des cytokines immunosuppressives IL-10 et *Transforming growth factor-beta* (TGF β) [50].

Apport des modèles animaux

Les conséquences fonctionnelles des dysfonctions immunitaires acquises et les déterminants cellulaires et moléculaires qui régulent la profondeur de l'immunodépression post-infectieuse restent mal connus. Afin d'évaluer les caractéristiques de la réponse de l'hôte à une infection secondaire survenant au décours d'un état infectieux, plusieurs études expérimentales ont tenté de modéliser cette situation clinique fréquente par une double agression infectieuse séquentielle chez la souris. D'une manière générale, le sepsis initial altère profondément les mécanismes de défense systémiques et pulmonaires de l'hôte et rend les souris hautement susceptibles à une infection secondaire. Le modèle le plus couramment utilisé est celui d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* induite 24 heures après un sepsis polymicrobien subléthal. Dans ce type de pneumonie précoce, un inoculum bactérien non léthal chez les animaux contrôles induit rapidement une forte létalité chez les animaux septiques [30-32]. Cette hyper-susceptibilité est en rapport avec une réponse pulmonaire inadaptée associant un défaut de clairance du pathogène et un profil cytokinique anti-inflammatoire par diminution de la production de TNF- α et augmentation de la production d'IL-10. La désactivation transitoire du macrophage alvéolaire, responsable d'un défaut de phagocytose et d'une altération de la production de TNF- α et d'IL-12, semble être un élément critique de la réponse de l'hôte dans ce type d'infection pulmonaire précoce [31,51,52]. La susceptibilité accrue des animaux septiques persiste pendant au moins huit jours après LPC. Malgré la récupération d'une clairance bactérienne comparable à celle de souris contrôles, ces pneumonies tardives sont caractérisées par une réponse inflammatoire exubérante [36].

Des modèles d'infections pulmonaires non bactériennes chez des souris préalablement soumises à une péritonite polymicrobienne ont permis d'appréhender le rôle critique de la balance Th-1/Th-2 dans les mécanismes de défense pulmonaire chez l'hôte septique. Ainsi, les animaux

survivants d'une LPC sont particulièrement susceptibles à une infection pulmonaire par *Aspergillus fumigatus*, un champignon opportuniste habituellement inoffensif chez l'hôte immunocompétent [53,54]. Les animaux septiques apparaissent en effet incapables de produire une réponse pulmonaire Th-1 nécessaire à l'éradication de ce pathogène. En revanche, le sepsis polymicrobien induit une exacerbation de la réponse granulomateuse de type Th-2 lors de l'administration d'œufs du parasite plathelminthe *Schistosoma mansoni* [55].

Si le sepsis polymicrobien confère une susceptibilité accrue à des pneumonies provoquées par des germes variés, l'administration de LPS s'accompagne en revanche d'une résistance aux infections secondaires liée une atténuation de la réaction inflammatoire et à une amélioration de la clairance bactérienne [56,57]. Ceci suggère d'une part que le choc endotoxinique induit par injection de LPS ne rend qu'imparfaitement compte des anomalies immunitaires induites par le choc septique, et d'autre part que l'immunodépression induite par le sepsis polymicrobien ne peut simplement être assimilée à la tolérance au LPS.

Mécanismes de régulation : déterminants cellulaires et moléculaires

Les cellules dendritiques

À l'interface entre immunité innée et adaptative, les CD apparaissent comme des cellules candidates intéressantes pour expliquer les réponses pulmonaires aberrantes observées au cours des infections secondaires chez l'hôte septique. Dans le modèle précédemment cité d'aspergillose pulmonaire invasive en phase post-septique, l'administration intratrachéale de CD générées à partir des précurseurs médullaires (*bone marrow-derived dendritic cells*, BMDCs) de souris non septiques permet de restaurer une réponse pulmonaire de type Th-1 nécessaire à l'éradication du pathogène, et finalement d'améliorer la survie [54]. Un effet bénéfique des BMDCs a également été rapporté dans un modèle de pneumonie secondaire à *P. aeruginosa*. Dans ce cas, le mécanisme d'action des CD exogènes a été rapporté à la modulation de la réponse inflammatoire pulmonaire mais sans amélioration de la clairance du pathogène [36]. De manière intéressante, les BMDCs obtenues à partir d'animaux septiques sont inefficaces pour réverser l'immunodépression post-septique, et à l'inverse sont capables de conférer une susceptibilité accrue aux infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez des animaux non septiques [36,58]. Ces données suggèrent que les CD ont des fonctions régulatrices cruciales dans l'organisation des défenses pulmonaires de l'hôte septique.

Récepteurs de type Toll

Les TLRs sont notamment exprimés par les cellules de l'immunité innée et reconnaissent spécifiquement certains déterminants moléculaires microbiens très conservés. Les TLRs jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse inflammatoire innée en réponse à une infection, mais sont également impliqués dans la maturation des CD aboutissant à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et à l'organisation de la réponse immunitaire adaptative. Si les variations de la signalisation dépendante des TLRs influencent l'amplitude de la réponse inflammatoire initiale, des arguments expérimentaux viennent maintenant impliquer les TLRs dans le développement de l'immunodépression post-septique. La signalisation dépendante des TLRs contribue notamment à l'apoptose des cellules immunitaires induite par le sepsis. Au cours du sepsis polymicrobien, l'inactivation des gènes codant pour TLR2, TLR4 ou TLR9 permet de prévenir l'apoptose des CD [34,59], et la déficience de la molécule adaptatrice MyD88 commune à ces récepteurs inhibe l'apoptose lymphocytaire [60]. Par ailleurs, la modulation de l'axe LPS/TLR4 semble jouer un rôle important dans le développement de l'immunodépression induite par le sepsis, comme en témoigne le profil cytokinique anti-inflammatoire induit par la restimulation ex vivo des monocytes et des CD par le LPS. De manière intéressante, les protéines IRAK-M et ST-2 qui sont des régulateurs négatifs de la signalisation TLR4, contrôlent respectivement la désactivation du macrophage alvéolaire et les capacités de production d'IFN- γ et de TNF- α des lymphocytes T au cours du sepsis polymicrobien. De fait, les souris septiques déficientes pour IRAK-M ou ST-2 apparaissent résistantes à une infection pulmonaire secondaire à *P. aeruginosa* [52,61]. Les TLRs semblent donc contrôler plusieurs étapes-clés dans le développement de l'immunodépression post-infectieuse.

Les lymphocytes T régulateurs

Les Tregs possèdent de multiples propriétés immunosuppressives susceptibles de contribuer à l'immunodépression post-infectieuse, incluant la production des cytokines IL-10 et TGF β , l'inhibition des fonctions des cellules présentatrices d'antigènes, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻, l'inhibition des réponses de type Th-1, voire l'induction d'une anergie lymphocytaire [62]. L'augmentation des Tregs induite par le sepsis est ainsi associée à une réponse lymphocytaire anergique ou suppressive [50,63]. De façon intéressante, dans un modèle d'infection pulmonaire secondaire par *Legionella pneumophila*, l'inhibition de l'activité suppressive des Tregs a permis de restaurer la prolifération des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ et d'améliorer la clairance bactérienne et la survie des animaux en

phase post-septique [47]. Ces données méritent d'être confirmées dans des modèles d'infections à pyogènes.

Les cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives représentent une population hétérogène de cellules immatures exprimant des marqueurs de différenciation myéloïdes et douées de propriétés immunosuppressives par inhibition de l'activation des lymphocytes T. À l'inverse de la plupart des cellules immunitaires, les cellules myéloïdes suppressives voient leur nombre augmenter de manière importante dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes secondaires au cours du sepsis [1,64]. Leur rôle physiologique au cours du sepsis et dans la susceptibilité aux infections secondaires reste à éclaircir.

Perspectives thérapeutiques

L'importance des monocytes et des CD dans la physiopathologie de l'immunodépression induite par le sepsis suggère que le maintien ou la restauration des fonctions de ces cellules constituent des perspectives thérapeutiques attractives pour la prévention ou le traitement des pneumonies nosocomiales bactériennes. À ce jour, quelques études cliniques de petite taille ont évalué l'intérêt d'une immunomodulation par de l'IFN- γ ou du GM-CSF. L'IFN- γ peut réverser la tolérance au LPS et a de nombreux effets immunostimulants (augmentation de l'expression du CMHII, de la production d'IL-12, du recrutement de leucocytes et activation des fonctions antimicrobiennes) potentiellement bénéfiques au cours du choc septique [26,65]. Dans une étude pilote randomisée, le GM-CSF a été administré à des patients porteurs de sepsis sévère et a permis de restaurer l'expression de HLA-DR et les capacités de production des cytokines des monocytes, associé à une diminution de la durée de ventilation mécanique [66]. Cependant, l'impact de ces modifications biologiques doit être précisé par des critères d'évaluation cliniques solides tels que la survie ou l'incidence d'infections nosocomiales et sur des effectifs plus importants. En outre, le potentiel pro-inflammatoire de ces cytokines est un frein à une utilisation thérapeutique non ciblée en pathologie humaine. L'immunomonitorage des patients septiques permettrait certainement de déterminer la population cible susceptible de bénéficier de ces traitements.

Conclusions

Le développement d'infections nosocomiales est particulièrement fréquent chez les patients septiques de réanimation, mais la démonstration d'une relation de causalité entre les deux agressions est difficile à établir dans les études clini-

ques. Les études expérimentales animales ont permis de démontrer formellement le rôle du sepsis dans la susceptibilité aux infections secondaires. La réponse de l'hôte septique envers une agression infectieuse secondaire apparaît déviée vers un profil anti-inflammatoire caractérisé par une désactivation des monocytes, une apoptose des cellules dendritiques et des lymphocytes, l'expansion de cellules immunosuppressives et la surproduction de médiateurs anti-inflammatoires. Ces données cliniques et expérimentales permettent de faire évoluer la classique notion d'immunoparalysie vers une entité plus générale de dysfonction immunitaire qui nous semble refléter de manière plus adéquate la complexité des réponses immunes induites par le sepsis.

Pour finir, il convient de souligner que les états inflammatoires aigus sévères d'origine non-infectieuse comme la pancréatite aiguë, le polytraumatisme ou la brûlure partagent des caractéristiques physiopathologiques communes avec le sepsis et peuvent également s'accompagner d'anomalies immunitaires acquises et d'une susceptibilité aux infections secondaires en clinique ou bien dans les modèles expérimentaux. Ces données soulignent le continuum physiopathologique de la réponse inflammatoire envers une agression infectieuse ou non-infectieuse, et suggèrent que des signaux de danger d'origine endogènes contribuent au développement de ces désordres immunitaires.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Boomer JS, To K, Chang KC, et al (2011) Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306:2594–605
2. Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, et al (1977) Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg* 186:241–50
3. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, et al (2008) Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 300:413–22
4. Luyt CE, Combes A, Deback C, et al (2007) Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 175:935–42
5. Chastre J, Fagon JY (2002) Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165:867–903
6. Landelle C, Lepape A, Francois A, et al (2008) Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:1054–65
7. Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, et al (2008) Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med* 34:292–9
8. Hartemink KJ, Paul MA, Spijkstra JJ, et al (2003) Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis? *Intensive Care Med* 29:2068–71

9. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, et al (2004) Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 170:621–5
10. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, et al (1998) Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 351:950–3
11. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A (2000) Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 181:176–80
12. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG (2006) Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 177:1967–74
13. Ashare A, Powers LS, Butler NS, et al (2005) Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L633–40
14. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, et al (2004) Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 169:1144–51
15. Pangault C, Le Tulzo Y, Tattevin P, et al (2006) Downmodulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on monocytes during human septic shock. *Crit Care Med* 34:1193–201
16. Fumeaux T, Pugin J (2002) Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1475–82
17. Munoz C, Carlet J, Fitting C, et al (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88:1747–54
18. Adib-Conquy M, Moine P, Asehnoune K, et al (2003) Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 168:158–64
19. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al (2000) NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1877–83
20. Escoll P, del Fresno C, Garcia L, et al (2003) Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 311:465–72
21. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, et al (2006) Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med* 34:2377–85
22. Pachot A, Cazalis MA, Venet F, et al (2008) Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol* 180:6421–9
23. Guignant C, Lepape A, Huang X, et al (2011) Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit Care* 15:R99
24. Caille V, Chiche JD, Nciri N, et al (2004) Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock* 22:521–6
25. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al (2006) Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 32:1175–83
26. Lukaszewicz AC, Grienay M, Resche-Rigon M, et al (2009) Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 37:2746–52
27. Landelle C, Lepape A, Voirin N, et al (2010) Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 36:1859–66
28. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, et al (2004) Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 30:605–11
29. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ (2010) Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock* 34(Suppl 1):15–21
30. Steinhäuser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, et al (1999) IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 162:392–9
31. Chen GH, Reddy RC, Newstead MW, et al (2000) Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. *J Immunol* 165:6496–503
32. Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, et al (2006) Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant “two-hit” model of sepsis. *Shock* 26:565–70
33. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, et al (2003) Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol* 171:909–14
34. Pène F, Courtine E, Ouaz F, et al (2009) Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect Immun* 77:5651–8
35. Wen H, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL (2008) Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood* 111:1797–804
36. Pène F, Zuber B, Courtine E, et al (2008) Dendritic Cells Modulate Lung Response to *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Model of Sepsis-Induced Immune Dysfunction. *J Immunol* 181:8513–20
37. Kushwah R, Oliver JR, Zhang J, et al (2009) Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol* 183:7104–18
38. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al (2002) Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 168:2493–500
39. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiebaut R, et al (2007) Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med* 33:148–52
40. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, et al (2009) Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* 13:R119
41. Grimaldi D, Louis S, Pène F, et al (2011) Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 37:1438–46
42. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al (2001) Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166:6952–63
43. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al (2002) Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18:487–94
44. Hotchkiss RS, Nicholson DW (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 6:813–22
45. Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, et al (2003) Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6724–9
46. Venet F, Pachot A, Debard AL, et al (2004) Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to

- the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 32:2329–31
47. Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sonego F, et al (2010) Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med* 38:1718–25
 48. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, et al (2010) The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care* 14:R19
 49. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, et al (2006) Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 177:7943–49
 50. Cavassani KA, Carson WFt, Moreira AP, et al (2010) The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood* 115:4403–11
 51. Reddy RC, Chen GH, Newstead MW, et al (2001) Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun* 69:1394–401
 52. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, et al (2006) Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J Clin Invest* 116:2532–42
 53. Benjamim CF, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL (2003) Septic mice are susceptible to pulmonary aspergillosis. *Am J Pathol* 163:2605–17
 54. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, et al (2005) Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* 105:3588–95
 55. Wen H, Hogaboam CM, Gauldie J, Kunkel SL (2006) Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile. *Am J Pathol* 168:1940–50
 56. Varma TK, Durham M, Murphey ED, et al Sherwood ER, (2005) Endotoxin priming improves clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in wild-type and interleukin-10 knockout mice. *Infect Immun* 73:7340–7
 57. Murphey ED, Fang G, Sherwood ER (2008) Endotoxin pretreatment improves bacterial clearance and decreases mortality in mice challenged with *Staphylococcus aureus*. *Shock* 29:512–8
 58. Pastille E, Didovic S, Brauckmann D, et al (2011) Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J Immunol* 186:977–86
 59. Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, et al (2008) Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 205:1277–83
 60. Peck-Palmer OM, Unsinger J, Chang KC, et al (2008) Deletion of MyD88 markedly attenuates sepsis-induced T and B lymphocyte apoptosis but worsens survival. *J Leukoc Biol* 83:1009–18
 61. Hoogerwerf JJ, Leendertse M, Wieland CW, et al (2011) Loss of suppression of tumorigenicity 2 (ST2) gene reverses sepsis-induced inhibition of lung host defense in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 183:932–40
 62. Belkaid Y (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7:875–88
 63. Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al (2009) Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 35:678–86
 64. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al (2007) MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 204:1463–74
 65. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al (1997) Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3:678–81
 66. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 180:640–8

Quand et comment décèdent les patients admis pour choc septique en réanimation ?

D Grimaldi (1); F Daviaud (2); J Charpentier (2); A Bouglé (2); JD Chiche (2); A Cariou (2); JP Mira (2); F Pene (2); (1) Service de Reanimation, CHU Cochin, CH Mignot le Chesnay, Paris; (2) Service de Réanimation Médicale, CHU Cochin - Saint-Vincent de Paul - Site Cochin, Paris.

Introduction

Le choc septique reste associé à une mortalité élevée. Les moyens modernes de réanimation permettent souvent de contrôler les défaillances d’organes pendant les premiers jours. Les patients sont alors exposés à des complications secondaires potentiellement létales. Peu de travaux se sont intéressés aux causes de décès des patients admis pour choc septique. L’objectif de cette étude était de préciser le délai et la cause du décès des patients admis pour choc septique en réanimation.

Patients et Méthodes

Les décès au sein de 3 cohortes de patients admis pour choc septique ont été étudiés. Il s'agissait d'études prospectives monocentriques successives (2008-2011). Les critères d’exclusions étaient communs aux 3 études : âge<18 ans, grossesse, immunodépression (hémopathie maligne, chimiothérapie, infection par le VIH et traitement immunosuppresseur). La prise en charge du choc septique était standardisée sans modifications des protocoles au cours de la période d’étude. Nous avons analysé le délai et la cause des décès intrahospitaliers. Le décès était considéré comme précoce s’il survenait avant J7. Les causes de décès ont été établies par consensus de trois investigateurs à partir des dossiers sources. Les variables continues ont été exprimées en médiane et interquartile. La comparaison des caractéristiques des patients décédés avant et après J7 a été faite par analyse univariée (logiciel SPSS 12.0).

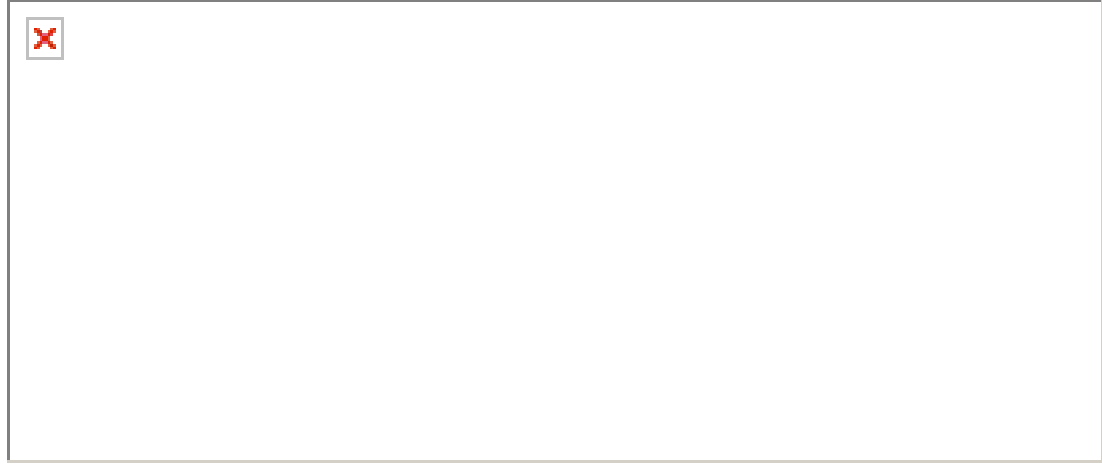
Résultats

Les trois cohortes regroupent un total de 158 patients. Parmi eux, 46 (29,1%) sont décédés au cours du séjour hospitalier. Les caractéristiques des patients décédés étaient les suivantes : âge 72 ans (60-79), sexe masculin 67.3%, 39 (84,8%) présentaient au moins une comorbidité. Le SAPS2 était de 71,5 (57-88), le SOFA des 24 premières heures de 14 (11-17). 12 (26,1%) présentaient un sepsis lié aux soins, Le foyer infectieux était pulmonaire chez 27 (58,7%) patients et abdominal chez 8 (17,4%). 40 (87%) ont eu une documentation microbiologique dont 16 (34,8%) par une bactériémie. Tous les patients ont été ventilés mécaniquement, 31 (67,4%) des patients ont reçu un traitement par HSHC et 12 (26,1%) par protéine C activée.

Le délai médian de survenue du décès était de 12 j (4-20) et répondait à une distribution trimodale (figure). 17 (37%) patients sont décédés avant J7 et 29 (63%) après J7. 19 des 38 patients (50%) décédés après J3 ont acquis au moins une infection lors du séjour en réanimation. La répartition des causes de décès était la suivante : 12 (26,1%) directement lié au processus infectieux initial, 11 (23,9%) ischémies mésentériques dont 10 ont été acquises lors du séjour en réanimation, 7 (15,2%) infections nosocomiales, 6 (8,7%) liés à une pathologie chronique sous-jacente, 4 (8,7%) événements iatrogènes et 7 (15,2%) causes diverses (2 AVC, 2 hémorragies, 1 embolie pulmonaire, 1 découverte d’un cancer incurable et 1 encéphalopathie persistante). Des limitations ou arrêt des thérapeutiques actives ont été mises en œuvre chez 16 (34,8%) patients.

Le type d'infection et les caractéristiques à l’admission des patients décédés avant ou après J7 étaient similaires à l’exception des scores SAPS2 et SOFA qui tendaient à être supérieurs chez les patients décédés avant J7 (p = 0,08 pour chaque). Le sepsis initial était plus souvent la cause de décès chez les patients décédés avant J7 par rapport aux patients décédés après J7 (58,8% vs 6,8%, p = 0,001). En revanche, les patients décédés tardivement présentaient plus

fréquemment des infections acquises en réanimation (58,6% vs. 11,8%, p = 0,002), et ont plus fréquemment fait l’objet de limitations et d’arrêt des thérapeutiques actives (51,7% vs. 5,9%, p = 0,001).



Conclusion

Chez des patients immunocompétents pris en charge en réanimation pour choc septique, près de 2/3 des patients décèdent au-delà du 7^{ème} jour, et 3/4 des décès ne sont pas directement causés par l’infection initiale. La mortalité d’origine vasculaire apparaît élevée. Ces données incitent à développer des thérapeutiques ciblant la mortalité tardive du choc septique.

Numéro de Résumé : **005572 (FR)**

Orateur : **D Grimaldi**

Structure : **(Congrès médecin) Inflammation et sepsis**

Références bibliographiques :

Mode d'étude : **Etude clinique**

Certificat de conformité :

Certificat CCPPRB : **Oui**

Certificat Comité d’Ethique : **Oui**

Engagement de cession de droits : **Oui**

Fait le **06/10/2012**

RESUME

Les infections graves entraînent une dysrégulation de la réaction inflammatoire associée à une immunodépression complexe associée à la survenue d'infections nosocomiales. Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent ces phénomènes demeurent largement incompris. A l'interface entre système immunitaire inné et adaptatif, les cellules dendritiques et les lymphocytes innés pourraient être impliqués dans l'immunodépression post-infectieuse. Par ailleurs, les récepteurs de type Toll (TLR) déterminent l'amplitude de la réponse inflammatoire initiale, mais leur contribution dans le développement de l'immunodépression post-infectieuse n'a pas été établie.

Les objectifs de ce projet de recherche étaient d'investiguer le rôle des cellules dendritiques, des lymphocytes de type innés et des voies de signalisation dépendantes des TLRs dans l'immunodépression induite par le sepsis. Nous avons mené ce programme de recherche en combinant une double approche translationnelle et expérimentale. Nous avons étudié la cinétique des cellules dendritiques circulantes chez le patient septique et montré que leur déplétion était associée à la survenue d'infections nosocomiales. L'analyse des trois sous-populations de lymphocytes T innés (lymphocytes $\gamma\delta$, NKT et MAIT) chez le patient septique a montré que seuls les lymphocytes MAIT présentaient une déplétion associée au sepsis sévère, dont la persistance était également corrélée à la survenue d'infections nosocomiales. Enfin, à l'aide de souris knockout nous avons étudié le rôle de TLR2, TLR4 et TLR5 sur la réponse anti-bactérienne dans un modèle murin de pneumonie secondaire à *P. aeruginosa* à distance d'un sepsis polymicrobien subléta. Nous avons montré que les souris déficientes pour TLR2 étaient protégées de l'infection secondaire grâce à une meilleure clairance bactérienne. Ce travail introduit des perspectives nouvelles dans la physiopathologie de l'immunodépression post-infectieuse et suggère des applications thérapeutiques potentielles.